



Facultad
de Química
UDELAR - Uruguay



Tesina de Grado para Licenciatura en Química

Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de hongos de la Antártida

Florencia Pólvora López

Tutora: Dra. Silvana Alborés, Área de Microbiología

Co-tutora: M.Sc. Noheilly Vasquez

Lugar de Realización:

Departamento de Biociencias

Facultad de Química

Universidad de la República

2025

Tabla de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Generalidades y aplicaciones de nanomateriales.....	2
1.2. Síntesis de nanopartículas.....	3
1.3. Síntesis de nanopartículas biogénicas.....	4
1.4. Síntesis de nanopartículas a partir de microorganismos antárticos.....	5
1.5. Efectos de las condiciones de reacción en la síntesis biológica de nanopartículas.....	6
1.6. Caracterización y estabilidad.....	9
1.6.1. DLS.....	10
1.6.2. NTA.....	11
1.6.3. Potencial Zeta.....	12
1.6.4. TEM.....	13
1.6.5. SEM y EDS.....	13
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivos Generales.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1. Síntesis y purificación de nanopartículas de plata a partir de hongos de la Antártida.....	14
3.1.1. Material Fúngico.....	14
3.1.2. Crecimiento del hongo.....	15
3.1.3. Síntesis de nanopartículas de plata.....	15
3.1.4. Purificación de las nanopartículas.....	15
3.2. Caracterización de las nanopartículas.....	16
3.2.1. Espectroscopía UV-visible.....	16
3.2.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Electroforesis Doppler Láser (Potencial Z).....	16
3.2.3. Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA).....	16
3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y Espectroscopía de dispersión de energía (EDS).....	16
3.3. Estabilidad coloidal a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica.....	17

4. Resultados y Discusión.....	17
4.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata.....	17
4.1.1. Síntesis de Nanopartículas a diferentes concentraciones de AgNO ₃	17
4.1.2. Síntesis de Nanopartículas de Plata a 20°C.....	21
4.2. Purificación y Estabilidad Coloidal.....	24
4.3. Caracterización de las Nanopartículas de Plata.....	28
4.3.1. NTA.....	28
4.3.2. DLS.....	29
4.3.3. Potencial zeta.....	30
4.3.4. HR-TEM.....	32
4.3.4.1. EDS.....	36
4.3.5. Comparación del tamaño de las AgNPs obtenidas mediante HR-TEM y DLS.....	37
5. Conclusiones y Perspectivas.....	39
6. Referencias.....	40

Resumen

En los últimos años, las nanopartículas (NPs) han despertado un creciente interés debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, que dependen de su tamaño, forma, composición y estabilidad. Por ejemplo, en la medicina son utilizadas para mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, mientras que en la agricultura son empleadas para optimizar la eficacia de los pesticidas y herbicidas. Entre ellas, las nanopartículas de plata (AgNPs) se destacan por su efecto antimicrobiano y por la baja probabilidad de desarrollar resistencia bacteriana, lo que ha favorecido su implantación en dispositivos médicos, textiles, entre otros.

La síntesis biológica de AgNPs a partir de bacterias, hongos, algas y plantas se ha convertido en una alternativa eficiente, económica y amigable con el medio ambiente en comparación con los métodos tradicionales. Particularmente en la síntesis mediada por hongos, los metabolitos producidos actúan como agentes reductores y estabilizantes (*capping*), proporcionando a las AgNPs estabilidad coloidal, una mayor actividad antimicrobiana y menor citotoxicidad. En este contexto, los microorganismos extremófilos de la Antártida representan una fuente valiosa para la obtención de nanomateriales, debido a sus adaptaciones fisiológicas y morfológicas que les permiten sobrevivir en condiciones de bajas temperaturas. Estas características los convierten en una valiosa herramienta tanto para la investigación científica como para el desarrollo de tecnologías innovadoras. Además, se ha demostrado que el uso de las bajas temperaturas puede mejorar el rendimiento de la síntesis y estabilidad de las NPs en comparación con los procesos realizados a temperaturas más altas.

En este trabajo se evaluó la capacidad de cuatro cepas de hongos filamentosos provenientes de la Antártida: *Cadophora* sp. (E404), *Talaromyces stollii* (D361), *Talaromyces radicus* (D204) y *Antarctomyces pellizariae* (F121) para sintetizar AgNPs. Se evaluó la influencia de las condiciones de reacción (concentración de AgNO_3 , temperatura y tiempo) sobre la síntesis, así como también la estabilidad coloidal de las AgNPs frente a las variaciones del pH, fuerza iónica y procesos de purificación por centrifugación. Las AgNPs obtenidas fueron caracterizadas mediante espectroscopía UV-visible, DLS, NTA, HR-TEM, EDS y potencial zeta. Los resultados demostraron que los hongos de la Antártida son capaces de sintetizar eficazmente AgNPs, con un mayor rendimiento a 20°C y utilizando una concentración de 10 mM de AgNO_3 como precursor en la mayoría de los casos. Las AgNPs sintetizadas por distintas cepas fúngicas mostraron variaciones en concentración, tamaño, polidispersidad, carga superficial y composición elemental; destacándose las obtenidas con la cepa E404 a 20 °C, que presentaron la mayor concentración ($2,1 \times 10^{10}$ partículas/mL), menor índice de polidispersidad (0,017), tamaño promedio de $53,3 \pm 22,7$ nm (HR-TEM) y una carga superficial de $-17,4 \pm 0,21$ mV. La composición determinada por EDS confirmó la presencia de Ag (6,46 %), junto a carbono, oxígeno y trazas de otros elementos. Además, las AgNPs mostraron buena estabilidad frente a variaciones de pH y fuerza iónica, y luego del proceso de la centrifugación.

Estos resultados demuestran que la síntesis biológica de AgNPs mediada por hongos antárticos permite obtener nanopartículas estables y en grandes cantidades, sin necesidad de emplear reactivos tóxicos ni requerir de elevados consumos energéticos, lo que refuerza la viabilidad de este enfoque como una alternativa sostenible.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, Síntesis biológica, Hongos, Antártida.

1. Introducción

1.1. Generalidades y aplicaciones de nanomateriales

La nanociencia estudia los fenómenos y la manipulación de los materiales a escala nanométrica. Por su parte, la nanotecnología se ocupa del diseño, la caracterización y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, tamaño y propiedades de materiales que presentan, al menos en una de sus dimensiones, una medida menor o igual a 100 nm, como por ejemplo las nanopartículas (NPs) (Mendoza y Rodríguez, 2007).

Las NPs pueden ser amorfas, cristalinas, esféricas, triangulares, etc. Debido a su pequeño tamaño, son capaces de alterar las propiedades físicas, químicas o biológicas de los materiales, influyendo en su comportamiento óptico, eléctrico o magnético. Estas características distinguen a las NPs de las de mayor tamaño de un mismo material, incluidas las partículas de metales, óxidos metálicos, no metales y cerámicos (Santos et al., 2017). Podemos apreciar que la nanotecnología es una disciplina que está estrechamente ligada a la química, la física, la biología, la medicina, la ingeniería, las industrias químicas y farmacéuticas, entre otras (Mendoza y Rodríguez, 2007).

Las aplicaciones de las NPs también dependen de su tamaño, forma y estabilidad. En medicina su uso ha permitido mejorar el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades, así como el marcaje de biomoléculas. Por otra parte, en cuanto al suministro de fármacos, su pequeño tamaño permite una acción terapéutica más adecuada y un fácil desplazamiento a través de la sangre y los tejidos para llegar a las células blanco y atravesar las barreras hematoencefálica y epiteliales (Santos, et al., 2017). En el área agrícola, también se han utilizado como nano pesticidas y nano herbicidas. En este sentido, Santos et al. (2017) señalaron que algunas industrias han desarrollado formulaciones basadas en nanopartículas, con tamaños que oscilan entre 100 y 250 nm, utilizando nanoemulsiones que permiten obtener suspensiones uniformes de pesticidas o herbicidas en forma nanoparticulada.

La obtención de nuevos productos nanotecnológicos representa un desafío para enfrentar la diseminación y adaptación de bacterias resistentes a antibióticos. A lo largo del tiempo, además, el uso indiscriminado o incompleto de los antibióticos ha favorecido la resistencia a los efectos esperados, dando lugar a la aparición de enfermedades producidas por microorganismos que ya no responden a los tratamientos. Este hecho se ha convertido en un problema para la salud pública a nivel mundial, con impactos económicos y sociales, para lo cual la nanotecnología representa una respuesta eficaz. (Elizondo et al., 2021).

Gracias a la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs), la probabilidad del desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos es baja, por lo que se ha propuesto implementar su uso sobre los distintos dispositivos de uso médico (válvulas, catéteres y vendas), a través de la modificación de sus superficies para inhibir la formación de los biofilm bacterianos. Esta estrategia ha sido aplicada también en las cremas tópicas, pinturas y textiles (Elizondo et al., 2021; Flores, 2014).

Del tamaño y forma de las NPs depende su capacidad antimicrobiana, así como también de su elevada relación área/volumen, la cual favorece una mayor interacción con los microorganismos. Se ha demostrado que las de menor tamaño presentan una mayor actividad, y que las de forma triangular son más efectivas que las NPs esféricas y las nanovarillas (Elizondo et al., 2021; Flores, 2014). Las AgNPs, óxido de zinc, cobre y los óxidos de hierro son las que han demostrado tener propiedades antimicrobianas (Flores, 2014). Sin embargo, las AgNPs resultaron ser las más eficaces frente a bacterias, hongos y virus. Por este motivo, se considera que la nanotecnología podría abrir nuevas vías para combatir y prevenir enfermedades (Elizondo et al., 2021).

1.2. Síntesis de nanopartículas

La síntesis de NPs se clasifica en dos enfoques principales: *top-down* y *bottom-up*. Los métodos *top-down* consisten en la reducción del tamaño de un material a escala nanométrica mediante procesos físicos, como la molienda, que suelen requerir un elevado consumo energético. En cambio, los métodos *bottom-up* implican la formación de NPs a partir de la agregación de moléculas dispersas en solución, como ocurre en los procesos químicos en medios coloidales o en la precipitación controlada de partículas desde una solución (Leyva Gómez, 2013).

Asimismo, otro criterio de clasificación distingue entre métodos físicos y químicos. Según Leyva Gómez (2013), los métodos físicos permiten la producción a gran escala de NPs; sin embargo, ofrecen un control limitado sobre el tamaño de las partículas, lo que genera distribuciones heterogéneas y efectos poco controlables en los sistemas biológicos. Mientras que, Guilger-Casagrande y Lima (2019) describen que los métodos químicos se basan en la reducción de los iones metálicos en solución, lo cual favorece la formación de pequeños grupos o agregados metálicos. De acuerdo a Santos et al. (2017), la síntesis química puede llevarse a cabo con varios métodos. Por ejemplo, la síntesis sol-gel, la reducción química, la tecnología aerosol, la litografía, entre otros. Estos métodos permiten generar grandes cantidades de NPs, aunque pueden requerir de un gran gasto energético, además del uso de sustancias químicas peligrosas y reactivos altamente contaminantes (Santos et al., 2017). La síntesis química de las AgNPs se desarrolla en dos etapas principales: nucleación y crecimiento. La nucleación se lleva a cabo cuando los iones de plata (Ag^+) se reducen a Ag^0 , permitiendo que los átomos se agrupen entre sí y se organicen en forma de partículas, dando lugar a la formación de los núcleos. Luego, durante el crecimiento, los átomos de plata adicionales se agregan a los núcleos preexistentes. La forma en que suceden estos procesos define la distribución del tamaño y la forma de las NPs. Por ejemplo, para obtener NPs monodispersas es fundamental que todas las partículas inicien su nucleación con la mínima diferencia de tiempo y que durante su crecimiento se evite la aglomeración, lo cual aumentaría el tamaño promedio (Elizondo et al., 2021).

Para mantener el tamaño deseado de las NPs se emplean agentes estabilizantes (*capping*), los cuales interactúan con su superficie, reduciendo la probabilidad de colisión y coalescencia entre ellas. De esta manera, se logra que sean estables durante varios meses a temperatura ambiente y que mantengan sus propiedades ópticas, físicas, características de los nanomateriales y sus aplicaciones (Elizondo et al., 2021).

Por consiguiente, para la síntesis química de las AgNPs se requiere de tres componentes fundamentales: un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante. El nitrato de plata (AgNO_3), es el precursor metálico más utilizado. Los agentes reductores son capaces de donar los electrones para la reducción de los iones Ag^+ a Ag^0 . Algunos de los más utilizados son el borohidruro de sodio (NaBH_4), el citrato trisódico, el poli etilenglicol (PEG), y los polisacáridos como la glucosa, almidón modificado, ciclodextrina, entre otros. Por otro lado, los agentes estabilizantes más empleados para evitar la aglomeración de las NPs son la poli-vinilpirrolidona (PVP), poli-vinilalcohol (PVA), PEG, y el citrato de sodio (Elizondo et al., 2021).

Como alternativa a los métodos físicos y químicos descritos anteriormente, surgieron los métodos biológicos. Si bien algunos métodos físicos y químicos permiten obtener nanopartículas con características controladas, suelen requerir condiciones extremas de temperatura y presión, así como el uso de reactivos tóxicos y costosos. Por otro lado, la síntesis biológica, emplea organismos o extractos biológicos para reducir y estabilizar los iones metálicos, ofreciendo una alternativa más sostenible, económica y ambientalmente amigable (Alborés et al., 2023; Santos et al., 2017).

1.3. Síntesis de nanopartículas biogénicas

En los últimos tiempos, la síntesis biológica de las AgNPs se ha convertido en una alternativa viable a los métodos convencionales; ya que es fácil, rápida, rentable y amigable con el medio ambiente (no se requiere de altas presiones ni de altas temperaturas, por lo tanto, no precisa de un gran gasto energético) (Alborés et al., 2023; Santos et al., 2017). Además, proporciona estabilidad coloidal y es útil para controlar el tamaño y la forma de las AgNPs.

La síntesis biológica puede llevarse a cabo a partir de diversos organismos, tales como algas, plantas, microorganismos, entre otros, que actúan como la fuente del agente estabilizante (*capping*) que constituye la superficie de las AgNPs biogénicas. En el caso de la síntesis microbiana de NPs, este agente de protección proporciona estabilidad y también puede presentar actividad biológica, incluida la actividad antimicrobiana o citotoxicidad (Alborés et al., 2023; Rupanshi et al., 2025).

Particularmente, la síntesis de NPs mediada por hongos puede ser ventajosa debido a la gran cantidad de metabolitos que se producen y que aumentan la productividad. Estos organismos son muy usados como agentes reductores y estabilizantes, debido a su tolerancia a los metales pesados y a su capacidad para internalizar y bioacumular metales. Por ejemplo, se ha informado que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* tienen la capacidad de metabolizar metales pesados y sintetizar nanopartículas metálicas (Sanguineto et al., 2023). Los hongos también tienen ventajas para aplicaciones industriales debido a la producción de grandes cantidades de proteínas y enzimas extracelulares, facilidad en el manejo de la biomasa, buena dispersión de las AgNPs y fácil manejo en producción a gran escala. Además, proporcionan el agente de protección que da estabilidad coloidal a las AgNPs (Alborés et al., 2023). Según el tipo de hongo, el recubrimiento también puede tener actividad biológica, actuando en sinergia con el efecto del núcleo de las AgNPs. También, se ha demostrado que aparte de proporcionar una mayor actividad antimicrobiana, el agente estabilizante sería el responsable de una menor citotoxicidad y genotoxicidad. Este es un factor a ser considerado para su uso como agente terapéutico en la salud humana y animal (Guilger-Casagrande et al., 2021).

Actualmente, los microorganismos se consideran como potenciales bio sintetizadores de varios tipos de NPs, cualidad que se asocia directamente a la capacidad de algunas especies de ser resistentes al estrés oxidativo (causado por la producción de radicales libres, H_2O_2 , etc.). Cuando la presencia de estos compuestos es excesiva, se generan consecuencias negativas porque alteran, por ejemplo, la funcionalidad de la membrana (Franco, 2021; Santos et al., 2017).

Las características de las NPs biogénicas dependen de las condiciones de reacción, tales como temperatura, tiempo, concentración de extracto, etc. Una de las principales ventajas de la síntesis por microorganismos radica en la disponibilidad de aminoácidos, proteínas y metabolitos secundarios liberados, los cuales pueden actuar tanto como agentes estabilizantes como reductores durante la formación de las NPs. Otra ventaja es por lo tanto la eliminación del paso adicional de estabilización requerido para prevenir la agregación de partículas. Mediante el uso de distintas condiciones o distintos extractos es posible controlar la forma, el tamaño y la dispersión de las NPs. Otras ventajas son la disponibilidad de una amplia gama de recursos biológicos, un menor requerimiento de tiempo, estabilidad y fácil solubilidad de las NPs preparadas en agua (Durán et al., 2023; Zhang et al., 2016).

La síntesis biogénica de las NPs puede clasificarse en dos tipos: síntesis intracelular y extracelular. En la síntesis intracelular, las NPs son producidas dentro de las células microbianas, incorporadas a la biomasa. Se postula que el proceso comienza con el atrapamiento de los iones metálicos mediante la atracción electrostática dada por los grupos funcionales electroatrayentes presentes en la pared celular. Luego, se da la biorreducción a través de proteínas intracelulares y cofactores para producir las NPs.

Mientras que en la síntesis extracelular la reducción de los iones metálicos ocurre en ausencia de biomasa mediante la acción de enzimas, proteínas, componentes exudados o liberados por los microorganismos (Lahiri et al., 2021; Rai et al., 2021).

La síntesis extracelular de las AgNPs es la que ha recibido mayor atención porque elimina los pasos posteriores de procesamiento en cuanto a la recuperación de las NPs intracelulares como, por ejemplo, la sonicación para alterar la pared celular, múltiples centrifugaciones y los pasos de lavado necesarios para la purificación de NPs, entre otros (Alborés et al., 2023).

1.4. Síntesis de nanopartículas a partir de microorganismos antárticos

Los microorganismos extremófilos son capaces de crecer y prosperar en condiciones ambientales extremas tales como pHs muy ácidos o alcalinos, temperaturas altas o bajas, entre otras. Estas condiciones adversas exigen que tengan características fisiológicas y enzimáticas únicas, convirtiéndolos en una fuente prometedora para diversas aplicaciones biotecnológicas. Dentro de los extremófilos, se encuentran los microorganismos adaptados al frío, que pueden clasificarse en psicrófilos (cuya temperatura óptima de crecimiento es $\leq 15\text{-}20^{\circ}\text{C}$) y psicrotróficos (crecen y exhiben actividad a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua y, también, pueden crecer a temperaturas de entre 20 y 30°C) (Carrasco et al., 2012; Kobashigawa et al., 2023).

La Antártida alberga una diversidad de microorganismos adaptados al frío en sus condiciones morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir a las bajas temperaturas. Si bien ese continente es una región poco explorada y que la mayor parte de la microbiota es desconocida, representa un recurso valioso tanto para la investigación científica como para el desarrollo de tecnologías innovadoras (Kobashigawa et al., 2023).

Santos et al. (2017) demostraron que el uso de microorganismos antárticos en la síntesis de NPs ofrece varias ventajas. En particular, observaron que el empleo de las bajas temperaturas puede mejorar la eficiencia de la síntesis y estabilidad de las NPs, resultando en la obtención de NPs más pequeñas y en mayores cantidades que las obtenidas a temperaturas elevadas. Además, estos microorganismos, así como sus proteínas, presentan una notable capacidad de adaptación a diversas condiciones (como las bajas temperaturas), lo que permite cierta flexibilidad en el entorno industrial, ya que pueden continuar produciendo NPs incluso fuera de sus condiciones óptimas (Kobashigawa et al., 2023).

Las enzimas adaptadas al frío, son componentes clave para la adaptación de los microorganismos antárticos. Estas enzimas exhiben una mayor eficiencia catalítica con respecto a sus contrapartes mesófilas a temperaturas inferiores a 20°C y muestran especificidades inusuales de sustrato. Asimismo, permiten flexibilidad en el entorno industrial, ya que los organismos sobrevivirían y continuarían produciendo NPs fuera de las condiciones óptimas, aunque con un menor rendimiento. Algunos ejemplos de estas enzimas incluyen las amilasas, celulasas, proteasas, lipasas, isomerasas, entre otros; utilizadas en las industrias alimenticias, biocombustibles y detergentes (Carrasco et al., 2012; Kobashigawa et al., 2023). Como resultado, existe un mayor interés en la búsqueda y caracterización de este tipo de enzimas para aplicaciones biotecnológicas (Salwoon et al., 2019).

De acuerdo a la capacidad de algunos hongos antárticos para sobrevivir en condiciones extremas y a su capacidad de adaptación, Salwoon et al. (2019), señalan que para que los procesos celulares de los psicrófilos sean eficientes, es fundamental que todos los componentes celulares estén adaptados. Esto incluye el mantenimiento de las membranas funcionales, la evolución de enzimas adaptadas al frío y estructuras proteicas altamente flexibles que mantengan el sitio activo, la alta eficiencia catalítica a

bajas temperaturas, el alto grado de termolabilidad y una energía de activación más baja. Por ejemplo, las lipasas (CLP), desarrollaron características estructurales específicas que proporcionan flexibilidad térmica alrededor del sitio activo y una alta actividad específica a bajas temperaturas. Estas propiedades han facilitado su incorporación en diversas aplicaciones industriales, como el procesamiento del cuero, las preparaciones médicas y farmacéuticas, la síntesis química fina, entre otros.

Asimismo, Miao et al. (2016), destacan que las glucosidasas (BGs) (grupo de enzimas que rompen enlaces en oligosacáridos, alquil y aril -glucósidos) han ganado importancia debido a su aplicación biotecnológica en procesos relacionados con la preparación de alimentos de origen vegetal. Las BGs derivadas de los microorganismos adaptados al frío exhiben una alta constante catalítica, una temperatura óptima baja y un alto grado de termolabilidad, especialmente en su centro activo, con respecto a las BGs de los microorganismos mesófilos y termófilos. Un ejemplo representativo es la enzima BglU, que ha sido clonada a partir de la bacteria antártica *Micrococcus antarcticus*. Esta enzima muestra las propiedades típicas de las enzimas adaptadas al frío, incluida una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas y una inestabilidad relativa a altas temperaturas. Su temperatura óptima es de 25°C y su actividad disminuye considerablemente en 30 minutos a temperaturas más altas.

1.5. Efectos de las condiciones de reacción en la síntesis biológica de nanopartículas

Si bien la síntesis de AgNPs mediada por microorganismos es simple y efectiva, los parámetros utilizados en el procedimiento deben optimizarse para lograr un buen rendimiento, monodispersidad, estabilidad y biocompatibilidad de las NPs, así como la reproducibilidad de la síntesis. Por lo que, el estudio de las condiciones de la síntesis biológica es muy importante para el desarrollo de procedimientos consistentes, ya que las características de las AgNPs obtenidas determinarán las propiedades de las NPs, y también sus aplicaciones. El control del tamaño y la forma de las NPs requiere de un ajuste de los parámetros utilizados en el crecimiento microbiano, y en la reacción de síntesis; como lo son el pH, la temperatura, la concentración de nitrato de plata (AgNO_3), la agitación, entre otros. Estos parámetros deben ser evaluados y estandarizados para cada proceso de síntesis desarrollado, ya que pueden influir tanto en la tasa de síntesis como en el tamaño y en la estabilidad de las NPs producidas (Alborés et al., 2023).

La temperatura utilizada en la síntesis de AgNPs mediante hongos puede afectar parámetros como la velocidad de síntesis, el tamaño y la estabilidad de las NPs. Sin embargo, no siempre un incremento en la temperatura acelera la síntesis de nanopartículas. Por ejemplo, Elamawi et al. (2018) sintetizaron AgNPs mediante el hongo *Trichoderma longibrachiatum*, siendo probada con tres temperaturas (23, 28 y 33°C), y cinco cantidades de biomasa fúngica, sin agitación, en presencia de AgNO_3 1 mM. La temperatura de 28°C ha sido la más favorable para la producción de AgNPs donde el color cambió después de 72 h de incubación con AgNO_3 ; y la espectroscopia de absorción UV-visible ha mostrado una absorbancia máxima a 385 nm. Sin embargo, la incubación a 23 y 33°C no ha mostrado cambios de color cuando se incubaron en las mismas condiciones; por lo que la temperatura de reacción ha tenido un efecto importante sobre la actividad enzimática. En el mismo trabajo, los autores citaron los estudios de Mohammed-Fayaz et al. (2009) quienes encontraron que el tamaño de las AgNPs biosintetizadas por *Trichoderma viride* oscilaba entre 10 y 40 nm a 27°C; mientras que, a 10°C, el tamaño oscilaba entre 80 y 100 nm. Por lo tanto, estos hallazgos contrastan con aquellos estudios que mostraron que un aumento en la temperatura de reacción ha resultado en una disminución en el tamaño de las NPs; mientras que, en este estudio, una disminución en la temperatura ha resultado en un aumento del tamaño (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

Además de influir en la velocidad de síntesis, la temperatura también puede afectar el tamaño y la estabilidad de las NPs. Por ejemplo, en el trabajo de Abdel-Rahim et al. (2017), el cual sintetizan AgNPs usando el hongo *Rhizopus stolonifer*, se obtuvieron NPs con tamaños significativamente diferentes, a temperaturas de 20, 40 y 60°C, observándose que el tamaño más pequeño fue a 20°C. El aumento del tamaño se debe a la baja actividad de las enzimas involucradas en la biogénesis de las AgNPs como resultado de una temperatura inadecuada; por lo que se concluye que una incubación a temperaturas más altas provoca la desnaturalización de las enzimas, conduciendo a un aumento en el tamaño de las partículas de acuerdo con la pérdida de actividad enzimática. Guilger-Casagrande y Lima (2019) respaldan esta explicación al indicar que el aumento de la temperatura, incrementa la energía cinética de las AgNPs en solución, al igual que la frecuencia de colisión entre las partículas, resultando en una mayor tasa de aglomeración.

Por su parte, Shahzad et al. (2019) sintetizaron AgNPs utilizando *Aspergillus fumigatus* BTGB10, obteniéndose un tamaño de 322,8 nm a 25°C; y que a medida que se incrementaba la temperatura, el tamaño también aumentaba, alcanzándose 1073,45 nm a 55°C; atribuido a la agregación de las NPs a mayor temperatura. Sin embargo, Husseiny et al. (2015) reportaron que el tamaño de las NPs producidas por *Fusarium oxysporum* disminuía a medida que se aumentaba la temperatura, siendo que el tamaño más pequeño (30,24 nm) se obtuvo a 50°C (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

En suma, estos resultados muestran que el efecto de la temperatura sobre el tamaño y la estabilidad de las NPs sintetizadas pueden variar de acuerdo a la especie de hongo utilizada. Según Husseiny et al. (2015), trabajar a temperaturas inadecuadas conducen a un aumento del tamaño de las NPs y a la pérdida de la estabilidad, debido a la baja actividad de las enzimas involucradas durante la síntesis (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

También puede ajustarse el pH en la síntesis, de manera de poder controlar las características de las NPs. Nayak et al. (2011) propusieron que la concentración de protones en el medio de reacción podría afectar los cambios conformacionales de las enzimas nitrato reductasa, lo que llevaría a la alteración de la morfología y del tamaño de las AgNPs. Sintubin et al. (2009) señalaron que, al aumentar el pH, aumenta la competencia entre los protones y los iones metálicos para establecer enlaces con regiones cargadas negativamente, resultando en un mayor éxito de la síntesis a un pH alcalino. Qian et al. (2013) también observaron que el pH alcalino favorecía la síntesis de AgNPs al agregarse AgNO_3 al filtrado del hongo *Epicoccum nigrum*. Du et al. (2015) encontraron que un pH más alcalino daba como resultado un tiempo de síntesis más corto, y valores más pequeños de distribución del tamaño de NPs y del índice de polidispersidad. Estas características indican una estabilidad mejorada, debido a la repulsión electrostática de los aniones presentes en la dispersión. Sin embargo, Husseiny et al. (2015), que utilizó *Fusarium oxysporum* para la síntesis de NPs, encontraron que la tasa de síntesis disminuía a medida que aumentaba el pH; sugiriendo que se debía a una menor actividad de las reductasas responsables de la síntesis a pH más alto (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

Algunos estudios han informado síntesis de NPs exitosas a pH neutro o ligeramente alcalino. En el caso del hongo *Isaria fumosorosea* a pH 8,5, la síntesis de NPs han mostrado mejores características fisicoquímicas, en comparación con las NPs sintetizadas a pH 4,5 y 6,5 (Banu y Balasubramanian, 2014). En la síntesis utilizando *Guignardia mangiferae* por Balakumaran et al. (2015) no se observó cambio de color entre pH 1 y 4, y la agregación de las NPs se observó a pH 3 y 4; mientras que la coloración aparece a pH 5 y 6. A medida que se aumentó el pH, la intensidad de la dispersión también aumentó, presentando las NPs monodispersas y con mayor estabilidad a pH 7 (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

En cuanto a la concentración de precursor, varios estudios de síntesis extracelular de AgNPs por hongos, emplearon AgNO_3 en una concentración de 1 mM

(Saxena et al., 2016; Xue et al., 2016). Kaviya et al. (2011) informaron que, en algunos casos, una concentración más baja del precursor metálico ha resultado en un tamaño de NP más pequeño y una dispersión mejorada. Sin embargo, otros estudios obtuvieron tamaños más pequeños al utilizar concentraciones intermedias de AgNO_3 . En el trabajo de Abdel-Rahim et al. (2017), obtuvieron el tamaño de NP más pequeño (2,86 nm) a 10 mM de AgNO_3 , mientras que se obtuvieron tamaños de 54,67 y 14,23 nm a 100 y 1 mM, respectivamente, a una temperatura de 40°C. Se observó que el agregado excesivo de iones metálicos con una concentración de 100 mM, da como resultado la formación de partículas muy grandes con forma irregular; debido al alto consumo de las enzimas celulares para la reducción de partículas (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

Por otro lado, Phanjom y Ahmed (2017) estudiaron la síntesis de NPs utilizando *Aspergillus oryzae* a concentraciones de AgNO_3 entre 1 y 10 mM. Se observó que a concentraciones de hasta 8 mM, las NPs presentaron tamaños entre 7,22 y 17,06 nm, en el cual los picos de absorbancia mostraron un desplazamiento hacia el rango UV (longitudes de onda menores); mientras que el tamaño aumentó a 45,93 y 62,12 nm a concentraciones de 9 y 10 mM, respectivamente y los picos de absorbancia han mostrado un desplazamiento hacia la región visible (longitudes de onda mayores). Por lo tanto, el aumento de la concentración del metal ha resultado inicialmente en la obtención de partículas más pequeñas debido a la disponibilidad de los diferentes grupos funcionales para la reacción; sin embargo, al aumentar la concentración del metal se formaron partículas más grandes, lo que puede deberse a la no disponibilidad de los grupos funcionales responsables de la reacción de reducción (Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

Además del efecto sobre el tamaño de las NPs, la concentración del agente reductor está relacionada con la cantidad de NPs producidas. En el estudio realizado por Birla et al. (2013), que emplearon *Fusarium oxysporum*; encontraron que la cantidad de NPs aumentaba a medida que aumentaba la concentración del precursor entre 0,1 y 1,5 mM; mientras que no se han observado diferencias a concentraciones más altas (Guilger-Casagrande y Lima, 2019). Estos hallazgos sugieren que existe un límite en la concentración de AgNO_3 utilizada, con el fin de obtener NPs con características fisicoquímicas satisfactorias. Según Shahzad et al. (2019), a medida que aumenta la concentración de AgNO_3 , la competencia entre los iones de plata y los grupos funcionales da lugar a NPs de gran tamaño acompañado de inestabilidad y agregación. Por otra parte, a medida que aumenta la concentración del precursor metálico, también aumenta la intensidad del color de la dispersión (Ahluwalia et al., 2014; Phanjom y Ahmed, 2017); y una mayor concentración de AgNO_3 puede provocar una mayor toxicidad (Balakumaran et al., 2015; Guilger-Casagrande y Lima, 2019).

1.6. Caracterización y estabilidad

Según Zhang et al. (2016), la espectroscopia UV-Vis es una técnica muy útil y fiable para monitorear la síntesis y la estabilidad de las AgNPs. Esta técnica es rápida, fácil, sencilla, sensible y selectiva para diferentes tipos de NPs, requiere un corto período de tiempo para la medición y, no requiere de calibración para la caracterización de partículas en suspensiones coloidales. Además, describen que las AgNPs poseen propiedades ópticas únicas que les permiten interactuar fuertemente con longitudes de onda de luz específicas. En estas NPs, la banda de conducción y la banda de valencia están muy próximas entre sí, en las cuales los electrones se mueven libremente, dando lugar a una banda de absorción de resonancia plasmónica superficial (SPR/RPS), producida por la oscilación colectiva de los electrones de las AgNPs en resonancia con la onda de luz. La absorción de las AgNPs depende del tamaño de partícula, del medio dieléctrico y del entorno químico. La observación de este pico, asignado a un plasmón de superficie, se encuentra bien documentada para diversas NPs metálicas con tamaños que oscilan entre 2 y 100 nm.

De acuerdo con Estevez et al. (2020), las propiedades plasmónicas de las AgNPs proporcionan un método sencillo para controlar la síntesis y la estabilidad coloidal a través de los espectros UV-visible. Tanto el cambio de color en la mezcla de reacción, así como también la aparición de una banda de absorción entre 400 y 450 nm que corresponde a la resonancia de plasmón superficial (SPR/RPS) son indicativos de que hay formación de AgNPs. Para ello se mide el espectro de absorbancia en el rango de 250-800 nm y se determina el pico máximo, a lo largo de diferentes tiempos de reacción.

Además, en los espectros UV-vis, un pequeño desplazamiento hacia la izquierda (desplazamiento al azul) o hacia la derecha (desplazamiento al rojo) en la longitud de onda máxima del pico de la SPR podría estar relacionado con la obtención de AgNPs de diversas formas, tamaños; o también con dependencias del disolvente de las AgNPs formadas (Darroudi et al., 2011).

La estabilización de las NPs puede lograrse mediante repulsión electrostática o estérica. La estabilización electrostática es realizada a través de moléculas cargadas, que son capaces de aumentar la resistencia de la barrera de carga. En la síntesis química de nanopartículas, esto se logra mediante la coordinación de especies aniónicas (como haluros, carboxilatos o poli oxoaniones), con partículas metálicas, resultando en la formación de una doble capa eléctrica (en realidad una multicapa eléctrica difusa); provocando la repulsión coulombica entre las NPs. Generalmente se utilizan surfactantes iónicos; como el surfactante aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) en la que se puede emplear en el caso de partículas con una carga superficial negativa, o también el cloruro o bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAC, CTAB) para el caso de partículas con una carga superficial positiva. Por otra parte, la estabilización estérica se puede lograr mediante la adsorción de polímeros sobre las superficies de las partículas, debido a las capas superficiales que poseen los polímeros. Puede lograrse mediante la presencia de materiales voluminosos, típicamente orgánicos, en los que, debido a su volumen, impiden que las NPs se difundan entre sí. Los polímeros (como PVAs, PEGs, PVPs, quitosano, polisacáridos, etc.) y cationes grandes como el alquilamonio son algunos ejemplos. La elección del estabilizador también permite ajustar la solubilidad de las NPs (Guilger-Casagrande y Lima, 2019; Sivera et al., 2014).

Es importante destacar que la aplicación de las AgNPs se encuentra limitada por el problema de la inestabilidad de la dispersión frente a la agregación, resultando en la formación de agregados grandes y disminuyendo el área de superficie activa; por lo tanto, se da una disminución significativa de sus propiedades únicas, como por ejemplo sus actividades antimicrobianas o catalíticas. En consecuencia, para mejorar la utilidad de las AgNPs y facilitar su uso en nuevas aplicaciones, estas partículas deben estabilizarse (Sivera et al., 2014).

Existen mecanismos de agregación basados en la inestabilidad coloidal producida por un aumento de la fuerza iónica. Además, al tratarse de NPs provenientes de síntesis biológica, su estabilidad podría depender de la naturaleza bioquímica de la envoltura de la NP, que es la que la estabiliza (Alborés et al., 2023). Por ejemplo, se ha demostrado en estudios de Sivera et al. (2014) que cuando se utiliza gelatina como agente estabilizante a pH ácido, se pierde estabilidad debido a la protonación de la proteína presente en la superficie, llevando a la agregación. Por lo tanto, las modificaciones en la reacción de síntesis alteran las características de la superficie de las AgNPs, incluyendo su estabilidad coloidal. Se modifica la formación del capping y por tanto también sus propiedades (Alborés et al., 2023; Korbekandi et al., 2013).

Se han demostrado casos de agregación de AgNPs después de la purificación por centrifugación, por lo que los espectros UV-vis son útiles para controlar la estabilidad coloidal, siendo un método sencillo y directo que permite evaluar la estabilidad, tanto para monitorear su calidad a lo largo del tiempo, así como también para evaluar la integridad de la solución coloidal al realizar los pasos de purificación o modificaciones de la superficie. La agregación de las AgNPs va a provocar que la SPR de las partículas

individuales se acoplen, generando una disminución en la intensidad de la banda SPR, así como también va a generar un desplazamiento del espectro visible hacia el infrarrojo y un ensanchamiento de los picos de adsorción. Por ejemplo, Sanguineto et al. (2018) informaron el desplazamiento y ampliación de la banda SPR hacia el infrarrojo después de la centrifugación de algunas AgNPs fúngicas. Aunque aún se desconoce el mecanismo de biosíntesis y el agente estabilizante, estas diferencias en la estabilidad de las diferentes NPs biosintetizadas (de diferentes cepas de hongos) podrían atribuirse a las capas orgánicas unidas al núcleo inorgánico de una manera menos o más estable (Sanguineto et al., 2018). Además, Estevez et al. (2019) informaron sobre la purificación y concentración de AgNP estables sintetizadas por *Penicillium expansum* (PeNP). Aquí el espectro UV-vis mostró un aumento significativo en la banda SPR a 439 nm luego de la purificación y resuspensión de las AgNPs en agua. También se evaluó la estabilidad coloidal de las PeNP a diferentes pH (3-9) y fuerza iónica (concentraciones de NaCl de 10 a 500 mM). De acuerdo a los resultados, no se produjeron cambios relevantes en los espectros UV-vis, demostrando que las NPs eran estables en condiciones relativamente amplias de pH y fuerza iónica (Estevez et al., 2019).

Para la caracterización de las AgNPs, además de la espectroscopia UV-visible, se utilizan varias metodologías. Algunas de ellas son: la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y de Barrido (SEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Difracción de Rayos X (XRD) y el Potencial Zeta. Estas técnicas se utilizan para determinar el tamaño, la distribución, la carga superficial y la morfología de las partículas (Alborés et al., 2023; Shanthi et al., 2016).

1.6.1. DLS

Una de las técnicas de caracterización es la Dispersión Dinámica de Luz (DLS), el cual permite medir la distribución del tamaño de las NPs en solución o en suspensión. El principio de medida consiste en que cuando las partículas son irradiadas con luz láser, la luz que se dispersa produce fluctuaciones de acuerdo al coeficiente de difusión, cuando las partículas experimentan un movimiento browniano (Ashizawa, 2019).

El movimiento browniano que experimentan las NPs es tal que las partículas que son más grandes, se mueven lentamente; pero las que son más pequeñas se mueven rápidamente, observándose como fluctuaciones. Es decir que, la propiedad de dispersión de la luz (parpadeo) debido al movimiento browniano de las NPs depende de la difusión de las mismas, por lo que se aquí se detecta la fluctuación de la luz dispersada que refleja el coeficiente de difusión y el diámetro de la partícula se calcula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (Ashizawa, 2019).

$$\zeta = \frac{\eta}{kT} \frac{6\pi}{D}$$

d : diámetro de partícula (nm), k : constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T : temperatura absoluta (K), η : viscosidad (mPa s), D : coeficiente de difusión ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$).

De acuerdo a Zhang et al. (2016), el DLS mide la luz dispersada por un láser que pasa a través de un coloide, basándose en la dispersión de Rayleigh de las NPs suspendidas. Luego se analiza la modulación de la intensidad de la luz dispersa en función del tiempo, permitiendo determinar el tamaño hidrodinámico de las partículas. El tamaño obtenido suele ser mayor que en TEM, lo que puede deberse a la influencia del movimiento browniano. El DLS es un método no destructivo utilizado para obtener el diámetro promedio de NPs dispersas en líquidos, así como el índice de polidispersidad (PDI). Presenta la ventaja de que es capaz de analizar una gran cantidad

de partículas en simultáneo; sin embargo, presenta varias limitaciones específicas de la muestra.

1.6.2. NTA

Otra técnica de caracterización que es similar al DLS es el NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), que proporciona una variedad de información a partir de una única técnica, como tamaño, distribución de tamaño, concentración, biomarcadores de superficie, etc. Este método también rastrea el movimiento browniano de las NPs en una solución utilizando un rayo láser, utilizando una cámara de alta sensibilidad para capturar la luz dispersa de las NPs en tiempo real. Al analizar las trayectorias de las NPs cuadro por cuadro en un período determinado, se calcula el coeficiente de difusión de cada partícula a partir de su movimiento y luego, se calcula el diámetro hidrodinámico utilizando la ecuación de Stokes-Einstein. Actualmente, existen dos modos de medida que se basan en la detección de señales de las luces dispersas de las NPs y en la emisión fluorescente de las NPs en las que son marcadas con fluorescencia (Kowkabany y Bao, 2024).

A pesar de que el principio de funcionamiento respecto al DLS es el mismo, hay ciertas diferencias entre ambos métodos. Por ejemplo, mientras que en el DLS se proporciona información acerca del tamaño y la distribución del tamaño analizando las intensidades de luz dispersada; el NTA genera un tamaño y una distribución de tamaño basados en números mediante visualización. Además, el DLS no ofrece información relacionada con la concentración, ya que analiza todas las partículas en solución simultáneamente, y tiene desafíos en cuanto al análisis de las muestras polidispersas, en donde las luces dispersas de los objetos más grandes dominan sobre los más pequeños. Una ventaja del DLS sobre el NTA es que el umbral de detección es superior (es de alrededor de 6 μm frente a 1 μm para NTA). Normalmente, el modo de dispersión de luz de NTA proporciona información precisa sobre el tamaño y la concentración en solución (Kowkabany y Bao, 2024).

Un ejemplo aplicado, puede verse en el trabajo realizado por Kowkabany y Bao (2024); en el que los tamaños de las vesículas extracelulares (EV) medidos por NTA han coincidido con los tamaños obtenidos en TEM. Sin embargo, las condiciones de la muestra afectan en gran medida las mediciones de NTA, como la dilución de la muestra, la pureza de EV, la temperatura de medición; además de la configuración del instrumento, la adquisición del video y la configuración del análisis de datos que requieren calibración y optimización para obtener resultados consistentes.

1.6.3. Potencial Zeta

El potencial zeta posee varias definiciones según el autor. Por ejemplo, Tibaquirá et al. (2007), menciona que está definida por la fuerza de repulsión entre partículas; y que es una medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y células en un líquido. De acuerdo a Dinger (2006), lo define como el potencial electrostático en el plano de corte de una partícula. El plano de corte se define como la distancia a partir de la superficie de la partícula, en la cual la capa de fluido adherida a dicha superficie puede ser cortada cuando la partícula se mueve a través del fluido. La capa de fluido en el plano de corte siempre viaja con la partícula, y todo el fluido que esté por fuera del plano de corte, se corta durante el movimiento de la partícula, y se reorganiza cuando se detiene dicho movimiento.

Mayoral et al. (2014), define al potencial zeta como la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. El valor de la diferencia de potencial puede medirse de una manera muy sencilla, sin embargo, la carga de la superficie y su potencial, no pueden ser medidos en los fluidos. También lo define como una propiedad física que tiene cualquier partícula que se

encuentra en una suspensión. Si alguno de los estados fundamentales de la materia se encuentra finamente disperso en otro, se tiene un sistema coloidal. Por lo tanto, el valor del potencial zeta se encuentra relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales, indicando el grado de repulsión entre las partículas adyacentes, cargadas en una dispersión. Algunos ejemplos de sistemas coloidales son el agua, la sangre y muchos productos farmacéuticos (Tibaquirá et al., 2007).

Para las partículas que son lo suficientemente pequeñas, un alto potencial zeta le otorga estabilidad, es decir que la solución o dispersión se va a resistir a la agregación (se estabilizan desde el punto de vista eléctrico); pero cuando el potencial es bajo, hay atracción entre las partículas que superan a la repulsión, formándose flóculos o coágulos. Por lo tanto, la estabilidad de las dispersiones también dependerá del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y de las fuerzas de atracción de Van der Waals (Mayoral et al., 2014).

En el trabajo realizado por Villafuerte et al. (2008) sobre la revisión de los aspectos de la estabilidad física y de caracterización de las “nanopartículas lipídicas sólidas” (SLN), establecen que el potencial zeta se encuentra relacionada con la carga sobre la superficie de una partícula e influye en las propiedades de los materiales coloidales, tales como: su estabilidad, la interacción con electrolitos y la reología de las suspensiones. En una partícula dispersa que es sometida a un campo eléctrico, se denomina superficie hidrodinámica de corte a aquella superficie que separa el medio estacionario de una partícula en movimiento, de sus iones y solvente enlazados; y su potencial es el potencial zeta. Consecuentemente, el potencial zeta se determina midiendo la velocidad de deslizamiento de la partícula en un campo eléctrico de fuerza conocida. Generalmente, las partículas con valores elevados de potencial zeta no presentarían una tendencia a la aglomeración, debido a las fuerzas de repulsión eléctrica. Este hecho se ha observado en las SLNs de tripolide (es un principio activo extraído de la hierba *Tripterygium wilfordii* Hook F., con actividad anti cancerígena en las células de cáncer de próstata humano) (Nowak, 2017), las cuales fueron preparadas con el fin de promover la penetración a través de la piel. Se obtiene que la absorción acumulada después de 12 horas fue del 73.5% mientras que la de un gel convencional fue de 45.3%. Estas SLNs mostraron un tamaño de partícula de 123 nm y un potencial zeta de -45 mV. Por lo tanto, las SLNs conservan su estructura al ser dispersadas en un hidrogel, evitando así su aglomeración y fenómenos de gelificación (Villafuerte et al., 2008).

Según Nie et al. (2023), el potencial zeta, es el potencial de una NP coloidal entre la superficie de cizallamiento y la solución, pudiéndose determinar la carga superficial de la NP, por lo tanto, es un indicador de gran importancia acerca de la estabilidad de las AgNPs. Cuanto más pequeña sea la partícula dispersa, mayor va a ser el valor absoluto del potencial zeta, por lo tanto, más estable será el sistema (Estevez, 2024).

El pH es un factor clave en cuanto a la carga superficial y a la estabilidad de las AgNPs. Cuando cambia el pH, cambia la cantidad de grupos básicos o ácidos en la superficie de las AgNPs, provocando un cambio en la carga superficial (es decir, en el potencial zeta) de la partícula. Cuando las cargas son cercanas a la neutralidad, la repulsión es baja por lo que las AgNPs se aglomeran o floculan; mientras que cuando la densidad de la carga superficial de la NP es alta (en valor absoluto), la repulsión electrostática es mayor y por lo tanto la suspensión de las AgNPs mantiene una alta estabilidad (Estevez, 2024; Nie et al., 2023).

1.6.4. TEM

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica valiosa, muy utilizada e importante para la caracterización de nanomateriales, en la que permite obtener medidas cuantitativas del tamaño de partícula, la distribución del tamaño y la morfología. Esta técnica proporciona una buena resolución espacial y la posibilidad de

realizar mediciones analíticas adicionales (Zhang et al., 2016). También permite obtener imágenes (como, por ejemplo, de campo claro u oscuro, en barrido, con contraste de número atómico y de difracción, tanto de amplitud como de fase), espectros (para la caracterización química, los espesores y los estados de oxidación) y patrones de difracción (para análisis estructural, incluyendo celdas unitarias, distancias interplanares y grupos espaciales, entre otros) (Mendoza y Avalos, 2020).

Para su análisis, las muestras deben tener espesores menores a 100 nm y tolerar la radiación ionizante de los electrones o ser sometidas a una preparación especial mediante metales pesados y ultramicrotomía, especialmente en las muestras biológicas; por lo que la preparación de la muestra requiere mucho tiempo (Mendoza y Avalos, 2020; Zhang et al., 2016).

En la síntesis de AgNPs a partir del extracto acuoso de hojas de *Annona reticulata*, Parthiban et al. (2019) emplearon TEM de alta resolución (HR-TEM) para obtener una mayor información acerca de los tamaños y de la forma de las AgNPs. Obtuvieron las AgNPs esféricas, con formación de dispersiones claras de pocos aglomerados, y que el tamaño promedio obtenido era de $7,67 \pm 1,2$ nm, $8,02 \pm 0,59$ nm y $8,34 \pm 0,18$ nm.

Por otro lado, Hassan et al. (2023) utilizaron HR-TEM para caracterizar la morfología de la superficie y el tamaño de las AgNPs, depositando una suspensión acuosa sobre las rejillas de cobre cubiertas con carbón y evaporando el solvente a temperatura ambiente. A partir de las micrografías TEM obtenidas con una resolución de 100 nm, se observó la distribución del tamaño de las NPs en las que se obtuvieron NPs esféricas de aproximadamente 50 nm; mientras que a través de las imágenes HR-TEM se confirmó la estructura cristalina de estas NPs, con un espaciado interplanar de 0,25 nm, correspondiente a los planos (111) de plata. Estos hallazgos indican que las NPs presentan una estructura cúbica centrada en la cara (FCC), con distancias interplanares de 0,23–0,25 nm, típicas de dicha configuración.

1.6.5. SEM y EDS

Por otro lado, la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) es una técnica que consiste en irradiar la muestra con un haz de electrones, generando imágenes a partir de los electrones secundarios emitidos. Este método permite determinar los diferentes tamaños, las distribuciones de tamaño, las formas y la morfología superficial de las partículas sintetizadas a escala micro y nanométrica. De manera similar a lo que ocurre con la TEM, la SEM permite estudiar la morfología de las partículas y obtener histogramas a partir de las imágenes obtenidas, ya sea mediante el conteo y medición manual de las partículas, o utilizando un software específico (Naito et al., 2018; Zhang et al., 2016).

La limitación del SEM radica en su incapacidad de esta técnica para resolver la estructura interna, pero puede proporcionar información valiosa acerca de la pureza y del grado de agregación de las partículas (Zhang et al., 2016).

Tanto el SEM como el TEM pueden complementarse con el uso de un Espectrómetro de Energía Dispersiva (EDS), herramienta que permite realizar análisis elementales de la muestra. Esta técnica proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre los elementos presentes, además de mapear su distribución superficial (Naito et al., 2018).

2. Objetivos

2.1. Objetivos Generales

- Síntesis biológica de nanopartículas de plata a partir de hongos aislados de la Antártida, caracterización y estabilidad.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad de sintetizar nanopartículas de plata a partir de cuatro cepas de hongos provenientes de la Antártida.
- Evaluar la incidencia de las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, concentración de nitrato de plata) en la producción de nanopartículas de plata.
- Caracterizar las nanopartículas de plata biogénicas.
- Evaluar la estabilidad de las nanopartículas de plata biogénicas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Síntesis y purificación de nanopartículas de plata a partir de hongos de la Antártida

3.1.1. Material Fúngico

Se evaluó la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de cuatro cepas de hongos provenientes de la Antártida, denominada en esta tesis F121, D361, E404 y D204. Estos hongos fueron aislados a partir de muestras de suelo y madera colectadas en la Antártida (Isla Rey Jorge, Base Antártica Gral. Artigas) y depositadas en la colección de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química. Asimismo, las cepas fueron identificadas previamente por el grupo como *Cadophora* sp. CCMGE404 (madera de Isla Ardley), *Talaromyces stollii* CCMGD361 (madera de Collins Bay), *Talaromyces radicus* CCMGD204 (suelo de Isla Ardley), *Antarctomyces pellizariae* CCMGF121 (madera de Mar de Drake) (Alborés et al., 2018, Clavijo, 2018). Con el objetivo de facilitar la lectura y el seguimiento de los resultados, a partir de este punto se emplearán las siguientes denominaciones simplificadas para cada cepa: *Cadophora* sp. CCMGE404 será identificada como E404, *Talaromyces stollii* CCMGD361 como D361, *Talaromyces radicus* CCMGD204 como D204, y *Antarctomyces pellizariae* CCMGF121 como F121.

3.1.2. Crecimiento del hongo

Las cepas mencionadas anteriormente se cultivaron en el medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) a una temperatura de 20°C. Una vez crecido el micelio, se transfirieron dos discos en 100 mL del medio de cultivo PDB (Potato Dextrose Broth), previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, crecieron a 20°C con agitación constante (150 rpm) durante 10 días.

3.1.3. Síntesis de nanopartículas de plata

Una vez crecido el micelio, se lo separó mediante filtración con filtro de papel estéril, y luego se lavó dos veces con agua destilada estéril de manera de eliminar todo el excedente de medio en el micelio. Al micelio húmedo, se le agregó la cantidad suficiente de agua destilada estéril de manera de que la concentración sea de 0,1 g/mL y luego se lo incubó a 20°C por 24 h con agitación constante (150 rpm).

Posteriormente, se separó el micelio del exudado extracelular mediante filtración con filtro de papel y posterior filtro de membrana estéril de 0,45 µm, en la que se obtuvo un filtrado libre de células. Al filtrado obtenido, se colocó para la reacción de la síntesis de nanopartículas igual volumen de solución 5 mM de AgNO₃. Dicha reacción se realizó por triplicado, además, se utilizó filtrado sin adición de AgNO₃ como control de la reacción. Tanto las muestras como el control se incubaron en la oscuridad a 37°C.

Se procedió al seguimiento de la síntesis de las nanopartículas de plata mediante la determinación de espectros de absorción UV visible entre 200 y 800 nm y midiendo el incremento de la absorción en el pico correspondiente a la RPS (Resonancia de Plasmón de Superficie) a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 hs). Para cada caso se registraron los espectros y se determinaron las absorbancias de los picos correspondientes a una longitud de onda de 421 nm.

Además, se estudió el efecto del cambio de las condiciones de reacción en la producción de nanopartículas y en su estabilidad. Para ello el procedimiento mencionado se repitió para las cuatro cepas a concentración de AgNO₃ de 10 mM en la reacción. Luego, en base a los resultados obtenidos se seleccionó una de las dos concentraciones para cada cepa, repitiendo el protocolo de síntesis de las nanopartículas a una temperatura de incubación de 20°C.

3.1.4. Purificación de las nanopartículas

Una vez finalizada la síntesis, se dio lugar a la purificación de las muestras, en donde se separaron las NPs obtenidas del medio de reacción en la que fueron sintetizadas (filtrado extracelular). Esto se realizó mediante centrifugación a 4°C durante 10 minutos, a una velocidad de 10000 rpm. Se quitó el sobrenadante y las NPs contenidas en el pellet fueron resuspendidas en 5 mL de agua destilada, y se centrifugó nuevamente en las condiciones mencionadas anteriormente (lavado). El lavado se realizó dos veces. Una vez finalizado el lavado se suspendieron las NPs en agua destilada, y se midieron en el espectro de absorción, observando la banda de absorbancia correspondiente a la RPS de las NPs purificadas.

3.2. Caracterización de las nanopartículas

3.2.1. Espectroscopía UV-visible

Esta técnica permitió caracterizar las NPs de Ag biogénicas mediante la detección de la banda correspondiente a la RPS a 400-450 nm, con el objetivo de monitorear la formación de las NPs y su estabilidad. Para ello, se empleó el espectrofotómetro UV/Visible Jenway 6715, en el rango de 250-800 nm.

3.2.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Electroforesis Doppler Láser (Potencial Z)

El diámetro hidrodinámico y las cargas de las nanopartículas, se determinaron mediante DLS y dispersión de luz electroforética (ELS), respectivamente, utilizando un analizador de tamaño de partícula/potencial zeta. Para ello, se empleó el equipo Nano-Zetasizer, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK. Las muestras se prepararon a pH 6 en agua desionizada y los análisis se realizaron a 25°C, viscosidad de 0,8872 cP, RI de 1,33 y un ángulo de retrodispersión de 173°. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados del tamaño de partícula y del potencial zeta se expresaron como media \pm desviaciones estándar (DE). Los resultados fueron tratados utilizando el software Malvern Zetasizer.

3.2.3. Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA)

Permitió determinar el tamaño y la concentración de las nanopartículas de plata utilizando el equipo ViewSizer™ 3000. Para ello, las muestras fueron dispersadas en un medio líquido adecuado y, en caso necesario, diluidas hasta alcanzar una concentración óptima (10^5 - 10^9 partículas/mL). El análisis se llevó a cabo empleando un sistema de iluminación con múltiples láseres (450 nm, 520 nm y 635 nm) que permite una detección optimizada de partículas de diferentes tamaños. La medición se realizó registrando videos del movimiento browniano de las nanopartículas, cuyos coeficientes de difusión fueron determinados mediante el software del equipo. Posteriormente, se calculó el tamaño de las partículas aplicando la ecuación de Stokes-Einstein y se obtuvo la distribución de tamaños y la concentración en la muestra. Las mediciones se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura para minimizar variaciones en los resultados.

3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

La Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución permitió visualizar las morfologías y medir la distribución de los tamaños de las nanopartículas. Para ello se resuspendió la muestra en etanol 95% y se secó. Posteriormente se observó con un microscopio electrónico de alta resolución (HR-TEM) JEOL JEM 2100 de 200 kV de tensión de aceleración (servicio de Microscopía de CURE Rocha, UDELAR), empleando una rejilla de cobre. Además, se estudió la composición química elemental con una sonda EDS de rayos X en la superficie de las nanopartículas. Luego, los tamaños de las nanopartículas se determinaron mediante análisis de las imágenes por ambas microscopías electrónicas utilizando el software Image J.

3.3. Estabilidad coloidal a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica

Una vez sintetizadas todas las NPs, se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad coloidal. El objetivo de este ensayo es evaluar qué tan estables son las NPs al variar el pH y la fuerza iónica del medio en el cual se encuentran. Para ello, primero se preparó una dilución de la solución de nanopartículas en agua destilada y se analizó su espectro de absorción en un rango de 250 a 800 nm mediante el espectrofotómetro UV-vis ya mencionado. Luego, se realizaron diluciones de las nanopartículas en un buffer MES a diferentes valores de pH (3, 5 y 9) y se registraron los espectros de

absorción en el mismo rango. Posteriormente, se efectuaron las diluciones en las soluciones de NaCl (475 μ L H₂O con NaCl más 25 μ L de las NPs) con distintas concentraciones (10, 50, 100 y 500 mM) para evaluar la influencia de la fuerza iónica sobre la estabilidad de las nanopartículas, midiendo nuevamente los espectros en el espectrofotómetro UV-vis. Finalmente, se compararon todos los espectros obtenidos para determinar el efecto de las variaciones de pH y fuerza iónica con respecto al espectro inicial.

4. Resultados y Discusión

4.1. Síntesis de Nanopartículas de Plata

4.1.1. Síntesis de Nanopartículas a diferentes concentraciones de AgNO₃

Se realizó la síntesis de las AgNPs para las cepas F121, D204, E404 y D361 evaluando distintas concentraciones de AgNO₃ (se evaluó a 5 y a 10 mM) para cada cepa. El seguimiento fue realizado mediante la obtención de los espectros de absorción UV-visible, en la que se observa un pico característico que corresponde a la Resonancia de Plasmón de Superficie (RPS) en un determinado rango de longitud de onda entre 400-450 nm (Figura 1). Las síntesis fueron monitoreadas al inicio de la reacción, a las 24, 48 y a las 72 hs de la síntesis.

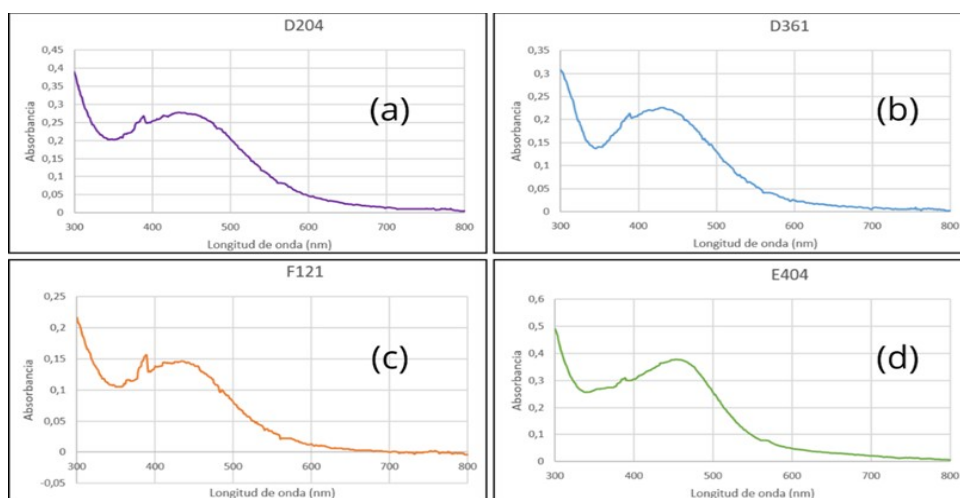


Figura 1. Espectros de la síntesis de AgNPs luego de 72 h a 37°C. (a) D204 (b) D361 (c) F121 y (d) E404.

Los máximos de absorción para estas NPs, se establecieron a una longitud de onda de 419 nm, los cuales fueron utilizados para monitorear la síntesis en función del tiempo. En las Figuras 2 a 5 se muestran las gráficas de los máximos de absorción a 419 nm en función del tiempo para las cuatro cepas sintetizadas a 5 y 10 mM de AgNO_3

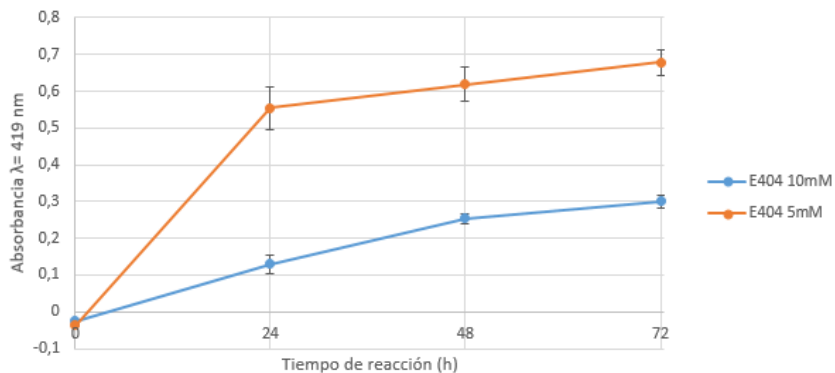


Figura 2. Gráfica de Absorbancia a 419 nm en función del tiempo correspondiente a la síntesis de AgNPs para la cepa E404 al utilizar 5 mM de AgNO_3 (naranja) y 10 mM de AgNO_3 (azul).

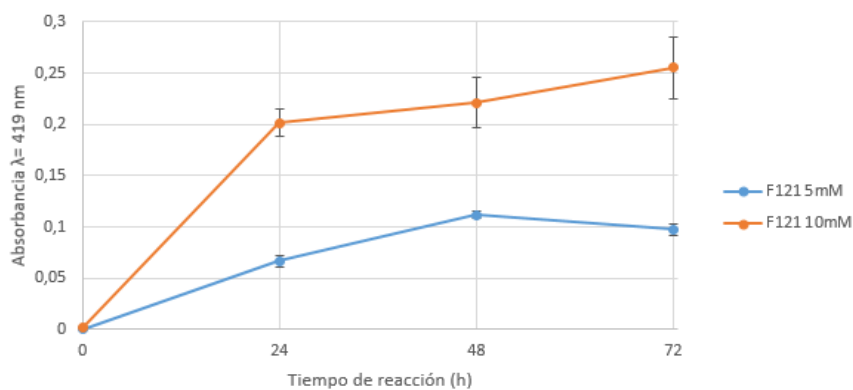


Figura 3. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa F121 al utilizar 5 mM de AgNO_3 (azul) y 10 mM de AgNO_3 (naranja).

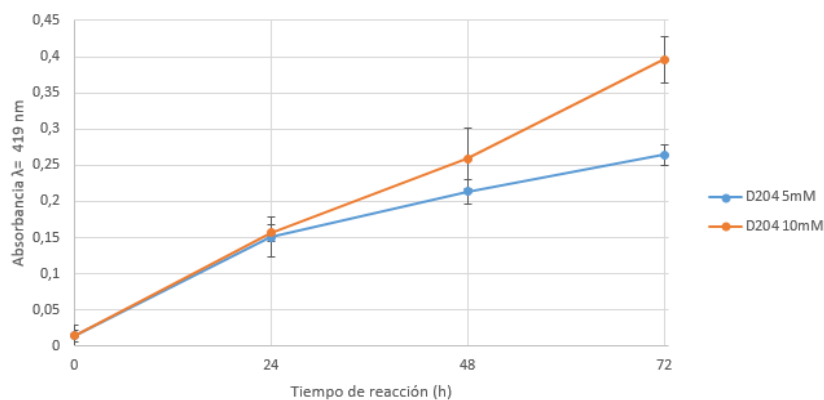


Figura 4. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa D204 al utilizar 5 mM de AgNO_3 (azul) y 10 mM de AgNO_3 (naranja).

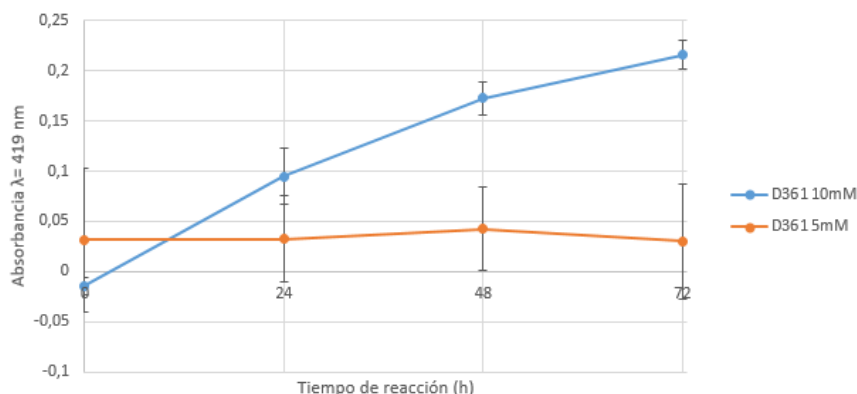


Figura 5. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa D361 al utilizar 5 mM de AgNO_3 (naranja) y 10 mM de AgNO_3 (azul).

De acuerdo con las gráficas, se observa que para las cepas F121 (Figura 3), D204 (Figura 4) y D361 (Figura 5), la síntesis de NPs con 10 mM de AgNO_3 , resultó en valores de absorbancias mayores en comparación con la síntesis realizada a 5 mM de AgNO_3 ; mientras que para las NPs de E404, se registraron absorbancias más elevadas al emplear 5 mM de AgNO_3 (Figura 2). Esto sugiere que hubo una mayor producción de AgNPs al emplear una concentración de 10 mM del agente precursor, con la excepción de la cepa E404.

Estos resultados se alinean con el estudio de Birla et al. (2013), el cual encontraron que la cantidad de las AgNPs obtenidas aumenta a medida que aumentaba la concentración del agente reductor entre 0,1 y 1,5 mM; sin embargo, no se observaron diferencias a concentraciones más altas (Guilger-Casagrande y Lima, 2019). Estos hallazgos sugieren que existe un límite en la concentración de AgNO_3 empleada, con el fin de obtener NPs con características fisicoquímicas satisfactorias. Según Shahzad et al. (2019), a medida que aumenta la concentración de AgNO_3 , la competencia entre los iones de plata y los grupos funcionales da lugar a NPs de gran tamaño junto con la inestabilidad y agregación.

Para el caso de la cepa E404, coincide con lo observado por Estevez et al. (2019, 2020); quienes también reportaron que una concentración de AgNO_3 5 mM fue la que proporcionó un mayor rendimiento para la biosíntesis de NPs. En el trabajo de Xue et al. (2016), evaluaron distintas concentraciones de AgNO_3 determinando que la concentración de 1,5 mM ha sido la más adecuada para una síntesis eficiente. Sin embargo, al aumentar la concentración a 5 mM, se redujo la eficiencia de la biosíntesis, volviéndose inestable y generando agregados, así como precipitados en el fondo del recipiente de reacción.

Al comparar la síntesis de las AgNPs entre las cuatro cepas utilizando 5 mM de AgNO_3 (Figura 6), se observó que la cepa E404 presenta la mayor concentración de AgNPs, registrando en todos los tiempos evaluados (24, 48 y 72 h) valores más altos de absorbancia. La cepa D204 también logró sintetizar AgNPs, pero en menor cantidad en comparación con E404; mientras que para las cepas D361 y F121, la síntesis no fue eficiente.

En cuanto a la síntesis con AgNO_3 10 mM (Figura 7), no se observaron diferencias importantes entre las cepas. No obstante, cabe destacar que las cuatro cepas lograron sintetizar AgNPs, mostrando un mayor valor de absorbancia para F121 y D204, a las 24 y 72 h, respectivamente.

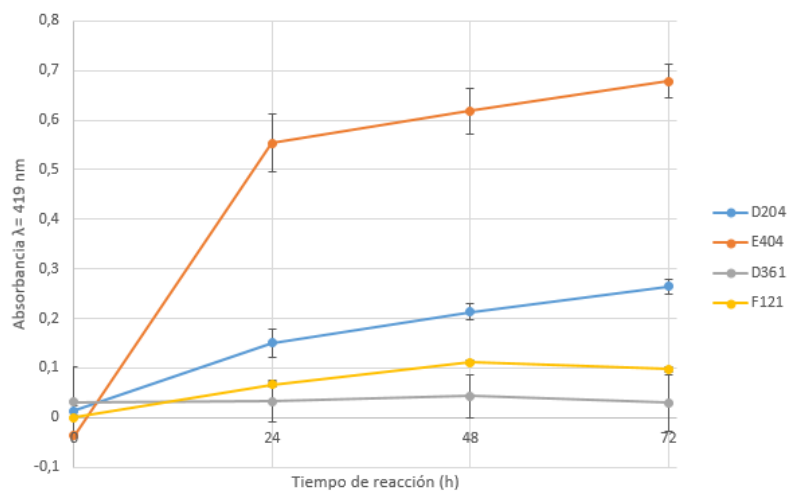


Figura 6. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis al utilizar 5 mM de AgNO_3 para las cepas D204 (azul), E404 (naranja), D361 (gris) y F121 (amarillo).

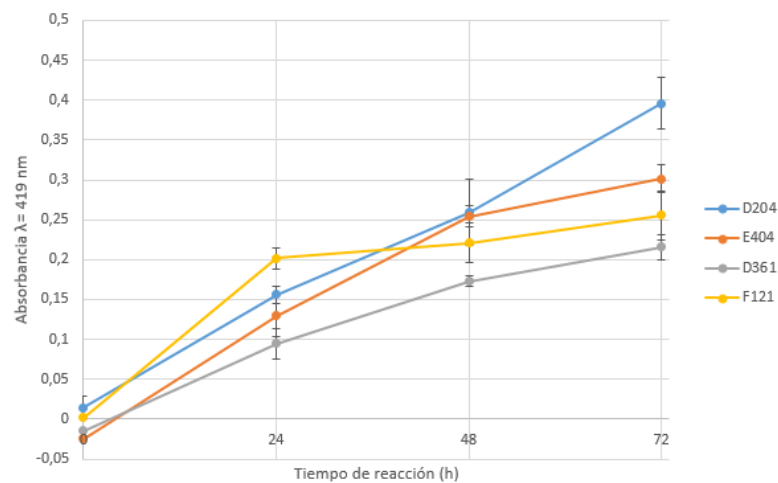


Figura 7. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis al utilizar 10 mM de AgNO_3 para las cepas D204 (azul), E404 (naranja), D361 (gris) y F121 (amarillo).

4.1.2. Síntesis de Nanopartículas de Plata a 20°C

La síntesis de AgNPs a 20°C se realizó de manera análoga que para la síntesis a 37°C, pero solamente para aquellas concentraciones de AgNO_3 que mostraron un mejor resultado. En función de este análisis, se evaluó la síntesis por las cepas D204, F121 y D361 utilizando 10 mM AgNO_3 y la cepa E404 con 5 mM de AgNO_3 .

El seguimiento de la reacción a 20°C fue realizado de manera similar que para la síntesis de AgNPs a 37°C.

En las Figuras 8 a 11 se muestran las gráficas de los máximos de absorción a 449 nm en función del tiempo obtenido para las cuatro cepas a 20°C de reacción, comparando con la síntesis realizada a 37°C.

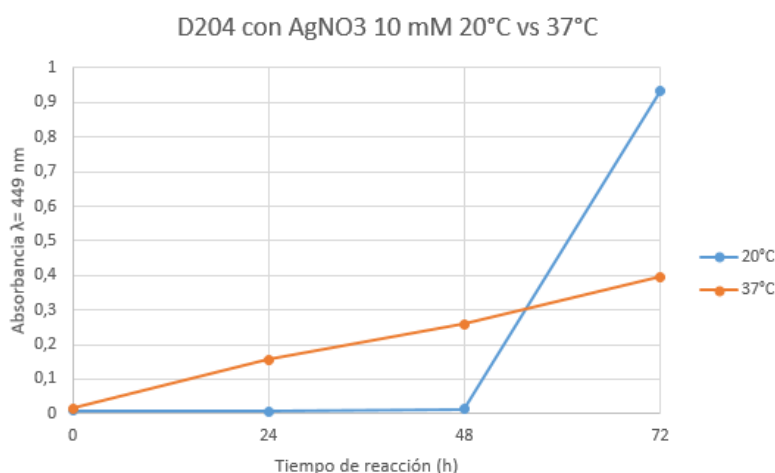


Figura 8. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa D204 a 20°C (azul) y a 37°C (naranja).

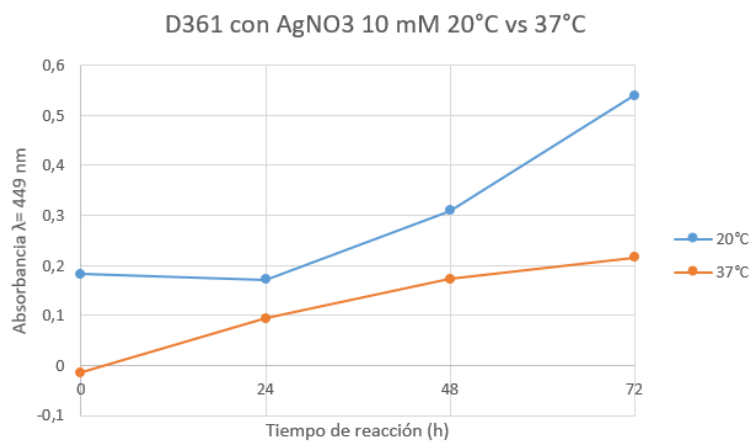


Figura 9. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa D361 a 20°C (azul) y a 37°C (naranja).

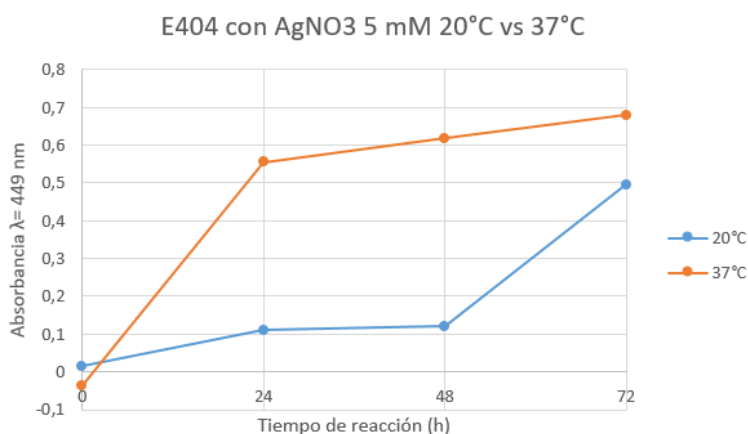


Figura 10. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa E404 a 20°C (azul) y a 37°C (naranja).

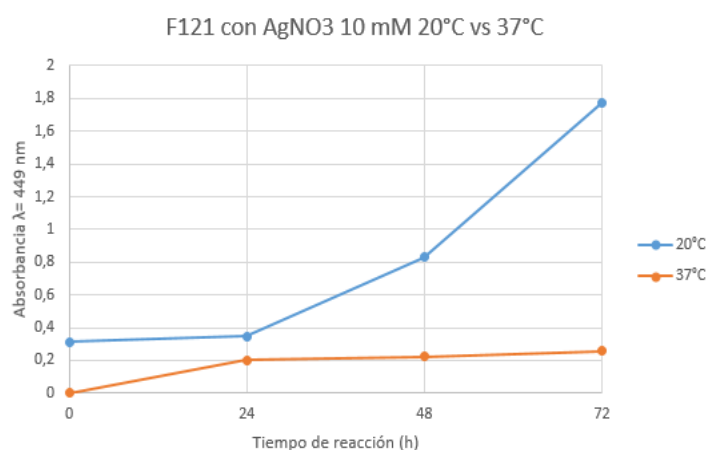


Figura 11. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo de síntesis para la cepa F121 a 20°C (azul) y a 37°C (naranja).

Al observar estas gráficas, se destaca que la síntesis a 20°C, luego de 72 h, fue más efectiva que a 37°C para las cepas D204, D361 y F121 (Figuras 8, 9 y 11, respectivamente); a excepción de la cepa E404, que mostró un comportamiento inverso (Figura 10). Esta diferencia sugiere que las biomoléculas involucradas en la síntesis de AgNPs podrían presentar una mayor actividad o estabilidad a 20 °C, algo esperado al tratarse de provenir de hongos psicotolerantes como los de la Antártida. En el estudio realizado por Abdel-Rahim et al. (2017), demostraron que tanto temperaturas muy bajas como muy elevadas pueden inhibir la producción de AgNPs debido a la inactivación de enzimas y otras biomoléculas. Si bien en nuestro trabajo no se utilizaron temperaturas extremas, la diferencia observada a 37°C podría atribuirse a una menor eficiencia de las biomoléculas secretadas o a una disminución de la actividad enzimática. Por ejemplo, en la síntesis de AgNPs mediante *Trichoderma longibrachiatum*, Elamawi et al. (2018) observaron que la producción de AgNPs fue máxima a 28 °C, mientras que a 23°C y 33°C no se detectaron cambios significativos. A partir de estos resultados, los autores sugieren que la temperatura de reacción ha tenido un efecto importante sobre la actividad enzimática. Además, a mayor temperatura, aumenta la energía cinética de las

AgNPs en la solución y la frecuencia de colisión entre las partículas, resultando en una mayor tasa de aglomeración (Abdel-Rahim et al., 2017).

Para la cepa E404, diversos estudios han demostrado que a medida que aumenta la temperatura de reacción, también lo hace la absorbancia. Esto se traduce en un incremento en la intensidad de los picos de la RPS, indicando una constante reducción de los iones de plata. Asimismo, el aumento de la absorbancia con la temperatura indica una mayor concentración de AgNPs formadas durante la reacción (Birla et al., 2013; Darroudi et al., 2011). Por otra parte, Estevez et al. (2019), observaron que el mayor rendimiento de la biosíntesis de la AgNPs fue a 37°C con un tiempo de incubación de 72 horas, mientras que en su estudio posterior (Estevez et al., 2020), la mayor producción de NPs también fue a 37°C, pero con 41 h de incubación.

En la síntesis realizada por Balakumaran et al. (2015) utilizando el hongo *Guignardia mangiferae*, encontraron que a 30°C era la temperatura óptima para la formación de AgNPs estables. Por el contrario, Singh et al. (2014) observaron una producción máxima de AgNPs a 25°C utilizando *Penicillium* sp.; además de observar que, a 40°C, la síntesis de AgNPs se enlentece debido a la disminución de la actividad enzimática.

En suma, en todas las síntesis de AgNPs realizadas, se ha observado la formación del pico característico correspondiente a la RPS con un máximo de absorbancia establecido a longitudes de onda de 419 nm (para la síntesis a 37°C) y 449 nm (para la síntesis a 20°C) (Figuras 1 y 12). Este comportamiento se ha manifestado en todos los tiempos de síntesis evaluados (0, 24, 48 y 72 h), lo que evidencia la síntesis exitosa de AgNPs.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Birla et al. (2013), quienes observaron una fuerte absorción en el rango visible debido a la RPS, con un pico de absorbancia a una longitud de onda de alrededor de 420 nm. De manera similar ocurre en la síntesis de AgNPs a partir de *Penicillium expansum* realizada por Estevez et al. (2019), observaron la aparición de las bandas de absorción entre 400 y 450 nm, también correspondientes a la RPS, lo que indica la producción de las AgNPs.

En la síntesis realizada por Abdel-Rahim et al. (2017) utilizando el hongo *Rhizopus stolonifer*, al igual que en el presente trabajo, los espectros de absorción UV-visible mostraron un pico de absorción característico a 420 nm atribuido a la RPS que presentan las AgNPs. Los autores señalaron que la RPS se debe a la interacción de los electrones libres confinados en pequeños objetos esféricos metálicos con episodios de ondas electromagnéticas. Además, evaluaron el efecto del tiempo de reacción, midiendo los espectros UV-Vis a diferentes tiempos (6, 12, 24, 36 y 48 h), encontrándose que la absorbancia a 420 nm había aumentado con el tiempo de incubación del AgNO₃ junto con el extracto de micelio, siendo la mayor producción de las AgNPs después de las 48 h de incubación. De forma similar, Khalil (2013) observó un aumento de la absorbancia hasta las 24 h, seguido de una estabilización o leve disminución a las 48 h en las cuatro especies de *Aspergillus* analizadas, lo que podría atribuirse a una reducción de la actividad de enzimas como la nitrato reductasa o a la disponibilidad limitada de cofactores.

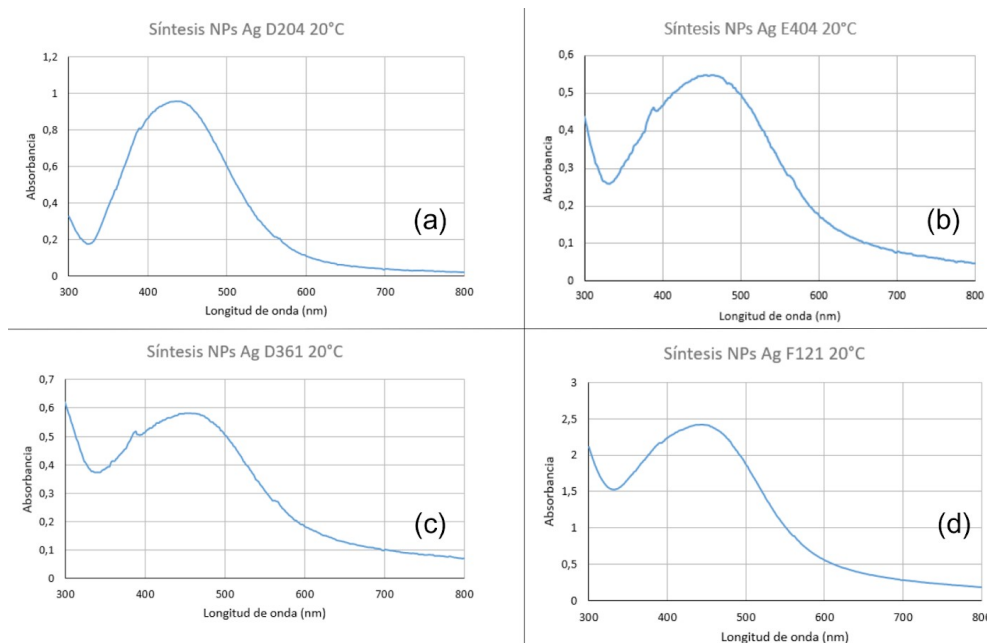


Figura 12. Espectros de la síntesis de NPs Ag a 20°C a las 72 hs: (a) cepa D204 con AgNO_3 10 mM, (b) cepa E404 con AgNO_3 5 mM, (c) cepa D361 con AgNO_3 10 mM y (d) cepa F121 con AgNO_3 10 mM.

4.2. Purificación y Estabilidad Coloidal

Una vez culminada la síntesis de las NPs, se llevó a cabo la purificación de ellas, en las que fueron sometidas a la centrifugación y al lavado de las NPs. Con la purificación se evaluó si la estabilidad coloidal de las NPs se mantuvo durante dicho proceso. La evaluación fue realizada mediante espectrofotometría UV-visible, con la detección del pico característico correspondiente a la RPS entre 400-450 nm.

En la mayoría de las NPs sintetizadas, se ha observado un aumento en la intensidad del pico correspondiente al RPS con respecto al pico del espectro a las 72 hs de síntesis, y que la banda correspondiente a la RPS se mantuvo (Figura 13, 14 y 16).

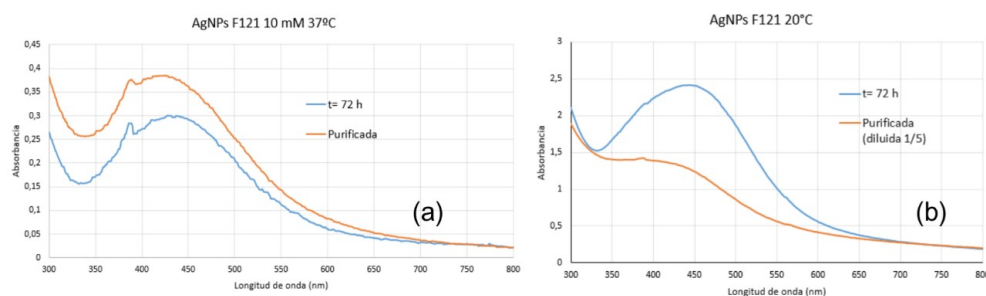


Figura 13. Espectros superpuestos de la síntesis de NPs a las 72 hs y sus respectivas purificaciones de la cepa F121 con AgNO_3 10 mM: (a) a 37°C, (b) a 20°C.

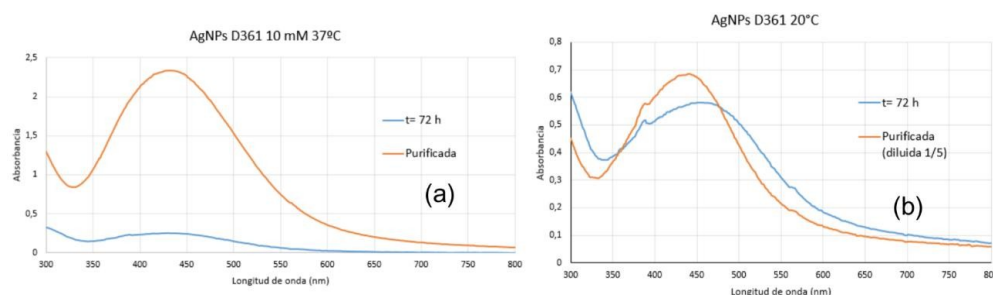


Figura 14. Espectros superpuestos de la síntesis de NPs a las 72 hs y sus respectivas purificaciones de la cepa D361 con AgNO_3 10 mM: (a) a 37°C, (b) a 20°C.

Esta observación es consistente con lo reportado por Sanguiniedo et al. (2019), la cual indica que en las condiciones dadas durante la centrifugación las NPs se pudieron separar sin perder la estabilidad coloidal (no agregaron). También explican que esta estabilidad luego de la centrifugación es indicativo de la formación de una capa orgánica fuertemente unida al core inorgánico de la NP metálica.

De acuerdo con los estudios de Estevez et al. (2019, 2020, 2021) sobre la síntesis de las AgNPs a partir de diferentes especies de hongos, al purificar dichas NPs por centrifugación y al analizarlas posteriormente mediante espectroscopia UV-Vis, se observaron las bandas de absorción correspondientes a la RPS de las AgNPs; indicando la estabilidad de las AgNPs.

Sin embargo, para el caso de la síntesis de NPs a partir de la cepa D204 usando 10 mM de AgNO_3 , al comparar los espectros correspondientes a 20°C, se observa una disminución de la intensidad en el pico de la RPS con respecto al de la síntesis a 72 hs, lo que indicaría que una proporción de las AgNPs pierden su estabilidad (se agregan) o no se recuperan totalmente con el proceso de centrifugación (Figura 15b).

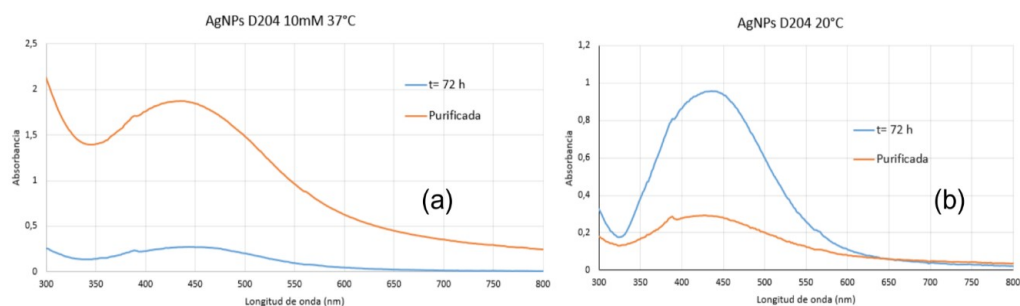


Figura 15. Espectros superpuestos de la síntesis de NPs a las 72 hs y sus respectivas purificaciones de la cepa D204 con AgNO_3 10 mM: (a) a 37°C, (b) a 20°C.

De acuerdo a lo reportado por Sanguiniedo et al. (2018) y Alborés et al. (2023), se ha demostrado que en algunos casos puede observarse agregación de AgNPs después de la centrifugación para la purificación. La agregación de las AgNPs, provoca que la RPS de las partículas individuales se acople, generando una disminución en la intensidad de la banda RPS, así como también va a producir un desplazamiento del espectro visible hacia el infrarrojo y un ensanchamiento de los picos de adsorción.

Por otra parte, la purificación de las AgNPs obtenidas de la cepa E404 ha mostrado un aumento en la intensidad del pico de RPS tanto en las síntesis realizadas a 37°C como a 20°C. Si bien la síntesis a 37°C fue más favorable (Figura 10), la concentración de las NPs obtenidas a 20°C, alcanzada luego de la purificación, fue aproximadamente 5 veces mayor que la obtenida en la síntesis (Figura 16). Teniendo en cuenta las ventajas de obtener un producto biotecnológico a 20 °C, se seleccionaron estas nanopartículas para los estudios posteriores de estabilidad coloidal y caracterización.

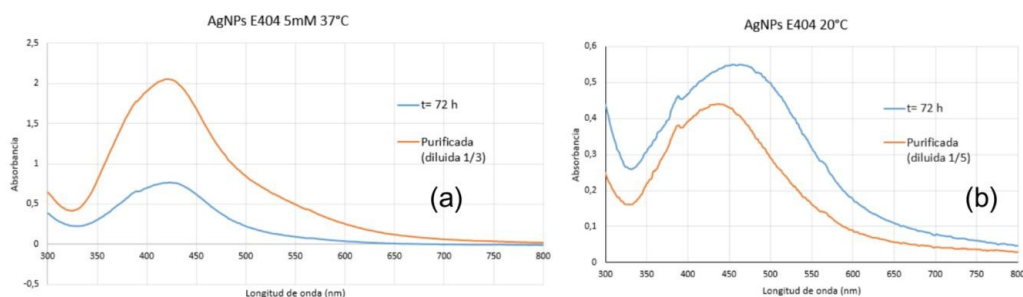


Figura 16. Espectros superpuestos de la síntesis de NPs a las 72 hs y sus respectivas purificaciones de la cepa E404 con AgNO_3 5 mM: (a) a 37°C, (b) a 20°C.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad coloidal frente a la variación del pH y de la fuerza iónica a partir de las AgNPs purificadas seleccionadas. Éstas fueron según su síntesis: (1) D204 a 37°C, (2) E404 a 20°C, (3) D361 a 20°C y (4) F121 a 20°C. Para la evaluación frente a la variación del pH, se estudiaron a valores de 3 (medio ácido), 7 (medio neutro) y 9 (medio alcalino); mientras que, para la fuerza iónica, se utilizó NaCl a concentraciones de 10, 50, 100 y 500 mM.

En cuanto a la evaluación de la estabilidad frente al pH, los espectros obtenidos, muestran que no se produjeron desplazamientos importantes hacia longitudes de onda mayores en el pico correspondiente a la RPS para las cuatro cepas, en ninguno de los tres valores de pH evaluados (Figura 17). Se puede decir entonces que las variaciones en ese rango de pH no afectan a la estabilidad de las AgNPs sintetizadas a partir de las cepas analizadas.

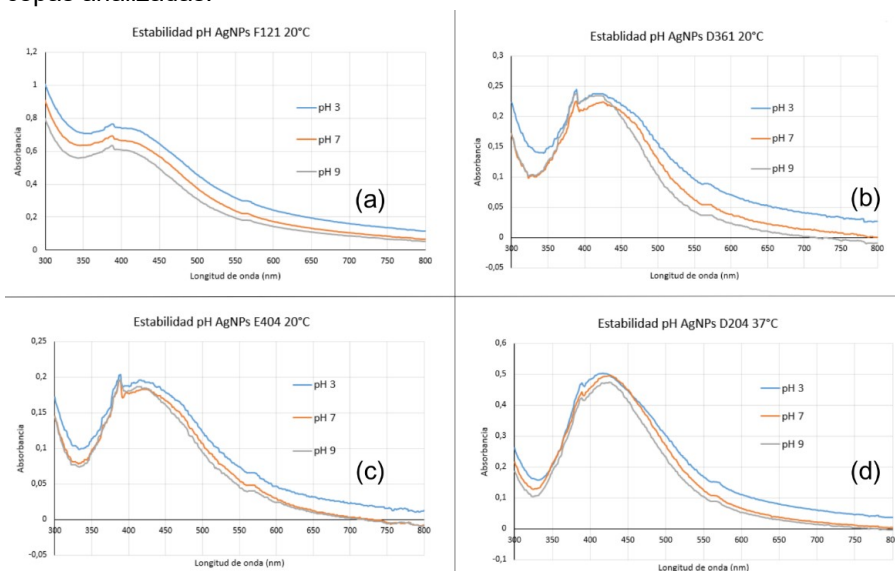


Figura 17. Espectros superpuestos de la evaluación de la estabilidad coloidal a pH 3 (azul), 7 (naranja) y 9 (gris): (a) cepa F121 a 20°C, (b) cepa D361 a 20°C, (c) cepa E404 a 20°C y (d) cepa D204 a 37°C.

Mientras que, para la evaluación de la estabilidad frente a la fuerza iónica, tampoco se observaron desplazamientos significativos hacia longitudes de onda mayores en el pico correspondiente a la RPS para las cuatro cepas, a lo largo de las cuatro concentraciones de NaCl evaluadas (Figura 18). Esto indica que la fuerza iónica no afectó a la estabilidad coloidal de las AgNPs sintetizadas.

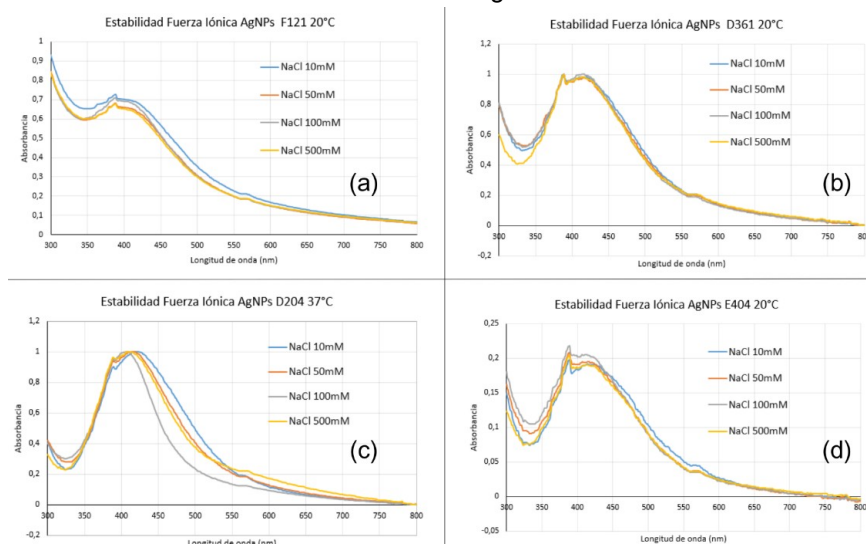


Figura 18. Espectros superpuestos de la evaluación de la estabilidad coloidal mediante fuerza iónica con concentraciones de NaCl de 10 (azul), 50 (naranja), 100 (gris) y 500 mM (amarillo): (a) cepa F121 a 20°C, (b) cepa D361 a 20°C, (c) cepa D204 a 37°C y (d) E404 a 20°C.

En conclusión, las AgNPs obtenidas a partir de las cepas estudiadas, son estables en un amplio rango de pH y de fuerza iónica. En las síntesis realizadas por Estevez et al. (2019, 2020), se evaluó la estabilidad coloidal frente a variaciones de pH y fuerza iónica en condiciones similares a las de nuestro trabajo. Al analizar los cambios en las longitudes de onda a diferentes pH y concentraciones de NaCl, no se observaron cambios significativos, lo que demuestra la estabilidad de las AgNPs en un rango relativamente amplio tanto de pH como de fuerza iónica. Sin embargo, a valores de pH extremos (pH = 3 y 9), se registró una disminución en la banda de RPS, lo que sugiere una leve agregación de las NPs. Estos resultados podrían atribuirse a la neutralización de las cargas superficiales. La agregación de las NPs puede generar una disminución de la intensidad en la banda de RPS, así como un desplazamiento del espectro visible hacia el infrarrojo. En este trabajo, para el caso de las AgNPs D361 a 20°C, a pH 3 se evidenció un muy leve ensanchamiento del pico, aunque sin disminución en la absorbancia (Figura 17 b).

Sanguineto et al. (2018) estudiaron la estabilidad coloidal de las AgNPs en función del pH (valores de 5 y 7) y de la fuerza iónica, utilizando el buffer MES a concentraciones de 10, 50 y 100 mM. Las mediciones se realizaron mediante espectroscopia UV-visible. Las NPs medidas han mostrado estabilidad en la mayoría de las condiciones evaluadas. No obstante, observaron una leve disminución en el pico de la banda de RPS al utilizar MES 10 mM a pH 5 para las NPs de *Phanerochaete chrysosporium* y *Penicillium expansum*, y con MES 100 mM a pH 7 para las de *Punctularia atropurpurascens*. Los autores sugieren que estas diferencias en el rango de pH en el que se presenta mayor estabilidad coloidal, podrían relacionarse con diferencias en la composición de la capa orgánica en cuanto al número total de los grupos funcionales COOH y NH₂.

4.3. Caracterización de las Nanopartículas de Plata

Las AgNPs seleccionadas previamente se caracterizaron utilizando técnicas complementarias como NTA, DLS, Potencial zeta, HR-TEM acoplado a EDS para las muestras D204 a 37°C, E404 a 20°C, D361 a 20°C y F121 a 20°C; con el objetivo de determinar el tamaño, concentración, forma, cargas superficiales netas y la composición elemental.

4.3.1. NTA

Mediante NTA se determinaron las concentraciones de las AgNPs obtenidas (Tabla 1). Si bien todas presentaron una concentración similar, las NPs producidas a partir de la cepa E404 a 20°C fueron las que presentaron la mayor concentración de partículas (Figura 19). Determinar las concentraciones de nanopartículas por esta técnica es de gran utilidad para sus diversas aplicaciones. Por ejemplo, para evaluar efectos de nanopartículas de distinto origen (como las sintetizadas en esta tesis) a iguales concentraciones en estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* o ser administradas a iguales dosis en modelos *in vivo*.

Tabla 1. Concentraciones de las AgNPs determinadas mediante NTA.

Cepa	Concentración (partículas/mL)
E404 20°C	$2,1 \cdot 10^{10}$
D361 20°C	$6,8 \cdot 10^9$
F121 20°C	$1,2 \cdot 10^{10}$
D204 37°C	$1,5 \cdot 10^{10}$

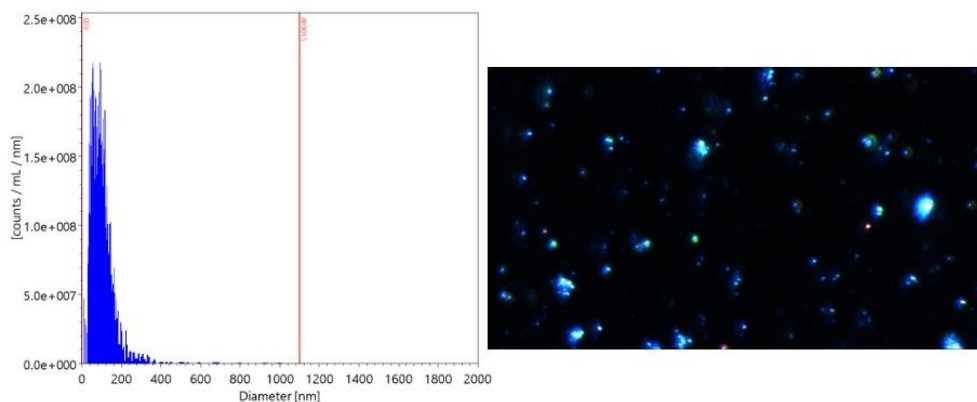


Figura 19. Histograma de la concentración de las partículas en función del tamaño (izquierda) y captura del análisis visual por NTA (derecha) para las AgNPs de la cepa E404 a 20°C.

4.3.2. DLS

Mediante la técnica de DLS se determinaron los tamaños hidrodinámicos de las AgNPs obtenidas a partir de las cepas mencionadas, así como el índice de polidispersidad (PDI). En la Tabla 2 se presentan los diámetros obtenidos, reportados como el diámetro promedio central de la población o percentil 50 (D50), junto con sus correspondientes desviaciones estándar y sus respectivos índices de polidispersidad indicados como “Poly”.

Tabla 2. Diámetros (D50) e índices de polidispersidad (Poly) de las AgNPs determinadas por DLS.

Cepa	D50 ± Desviación Estándar (nm)	Poly
D361 20°C	49,0 ± 10,9	0,437
D204 37°C	57,3 ± 13,1	0,475
E404 20°C	47,8 ± 11,4	0,017
F121 20°C	28,5 ± 1,45	0,336

Según lo observado en la Tabla 2, las AgNPs sintetizadas por la cepa D204 presentaron el mayor PDI, mientras que las AgNPs obtenidas a partir de la cepa F121 mostraron un menor diámetro hidrodinámico y las de la cepa E404 presentaron el menor PDI.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Da Costa et al. (2025), quienes reportaron tamaños hidrodinámicos promedio de $35,4 \pm 12,4$ nm para las AgNP@Fo VR039 (AgNPs obtenidas mediante el filtrado del secretoma del hongo *Fusarium oxysporum*) y de $28,6 \pm 9,5$ nm para las AgNP@Fo 07SD. En cuanto al PDI, se obtuvieron valores de 0,48 para la cepa VR039 y 0,42 para 07SD; similares a los obtenidos en el presente trabajo para las cepas D361 y D204. Los autores indican que un PDI entre 0,42 y 0,48 representa una distribución de tamaño que, si bien no es completamente monodispersa, refleja un control razonable. Este grado de uniformidad se considera aceptable para las NPs biosintetizadas a partir de secretomas fúngicos, teniendo en cuenta la mayor variabilidad en las composiciones de los extractos de origen biológico, comparado con el uso de reactivos puros utilizados en síntesis químicas convencionales.

Por otra parte, Sanguineto et al. (2023) obtuvieron un diámetro hidrodinámico de $17,5 \pm 1,1$ nm y un PDI de 0,211 en AgNPs sintetizadas a partir de filtrados del hongo *Trichoderma harzianum*. Este valor de PDI indica una distribución ligeramente polidispersa, ya que se encuentra por debajo del umbral de 0,4. Los autores destacan que el tamaño determinado por DLS fue superior con respecto a otras técnicas de caracterización, lo cual es esperable dado que el DLS mide el tamaño hidrodinámico, es decir, el tamaño de la NP junto con el agente de recubrimiento y la capa líquida que rodea la partícula.

En comparación con los estudios mencionados, las AgNPs obtenidas en el presente trabajo presentaron tamaños hidrodinámicos mayores, con la excepción de las sintetizadas por la cepa F121, cuyo tamaño fue similar al reportado por Da Costa et al. (2025) para las AgNP@Fo 07SD. Cabe destacar que el valor del PDI correspondiente a las AgNPs de la cepa E404 fue considerablemente menor en relación con el resto de las AgNPs estudiadas y a los valores reportados en los trabajos citados, lo que sugiere una distribución de tamaño más homogénea.

4.3.3. Potencial zeta

Se determinaron las cargas superficiales netas de las AgNPs obtenidas a partir de las cepas mencionadas, junto con sus correspondientes desviaciones estándar. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos, mientras que en las Figuras 20 a 23 se muestran los diagramas de distribución correspondientes:

Tabla 3. Potenciales zeta de las AgNPs sintetizadas a partir de las cepas D204 a 37°C, E404 a 20°C, D361 a 20°C y F121 a 20°C.

Cepa	Potencial zeta \pm Desviación Estándar (mV)
D361 20°C	-13,2 \pm 1,12
D204 37°C	-15,9 \pm 0,00
E404 20°C	-17,4 \pm 0,21
F121 20°C	-17,3 \pm 0,15

De acuerdo a lo observado en la Tabla 3, todas las AgNPs obtenidas a partir de estas cepas presentaron una carga superficial neta negativa. Sin embargo, podemos destacar que las AgNPs de las cepas E404 y F121 muestran valores más negativos (mayor carga superficial) en comparación con las NPs obtenidas de las cepas D204 y D361, siendo esta última la que exhibe una menor carga superficial. Estos valores son consistentes con los resultados reportados por El deeb et al. (2025), quienes obtuvieron un potencial zeta de -18,41 mV, lo cual sugiere una estabilidad moderada, probablemente atribuida a la presencia de proteínas fúngicas que actúan como agentes estabilizantes, confirmando carga negativa en la superficie de las AgNPs. Esto genera fuerzas de repulsión entre las partículas, evitando la aglomeración. Además, los autores señalan que las AgNPs con un potencial zeta superior a ± 30 mV se consideran altamente estables.

Según el trabajo realizado por Sanguineto et al. (2023), las medidas del potencial zeta mostraron la estabilidad coloidal de las NPs; las NPs con un potencial neto cercano a cero pueden agregarse, perdiendo sus propiedades como nanomateriales; y además que las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las cargas superficiales negativas de las AgNPs podrían desempeñar un papel importante en la estabilidad. De manera similar, en las medidas realizadas por Estevez et al. (2019, 2020, 2021), se obtuvieron valores relativamente altos y con carga superficial negativa, evidenciando la estabilidad coloidal de las NPs. Sin embargo, los autores advierten que las suspensiones de NPs con valores de potencial zeta cercanas a la neutralidad, no presentan una repulsión electrostática suficiente como para mantener la estabilidad en solución, por lo que pueden perder sus propiedades como nanomateriales debido a que se puede favorecer los fenómenos de precipitación o agregación (Estevez et al., 2019, 2021).

Por otra parte, Ballottin et al. (2016), registraron el potencial zeta de las AgNPs a un valor de $8,48 \pm 0,45$ mV, sugiriendo que puede haber superficies con baja carga y, por lo tanto, AgNPs inestables.

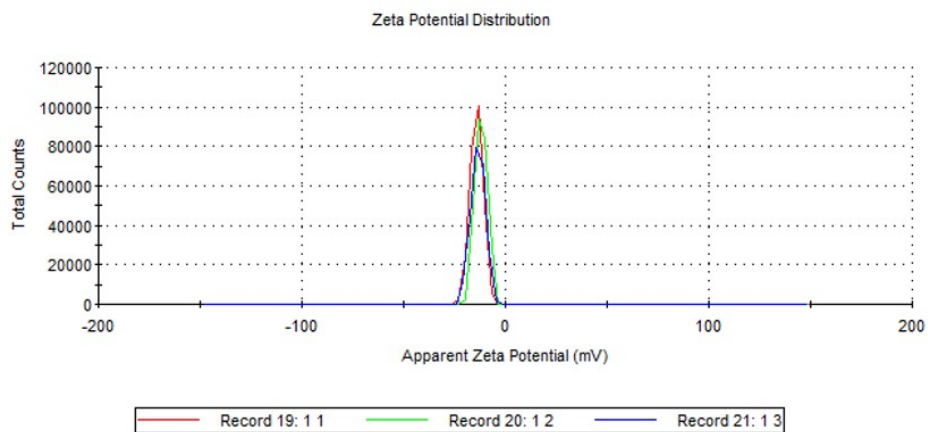


Figura 20. Diagrama de distribución del potencial zeta para las NPs de Ag de la cepa D361 a 20°C

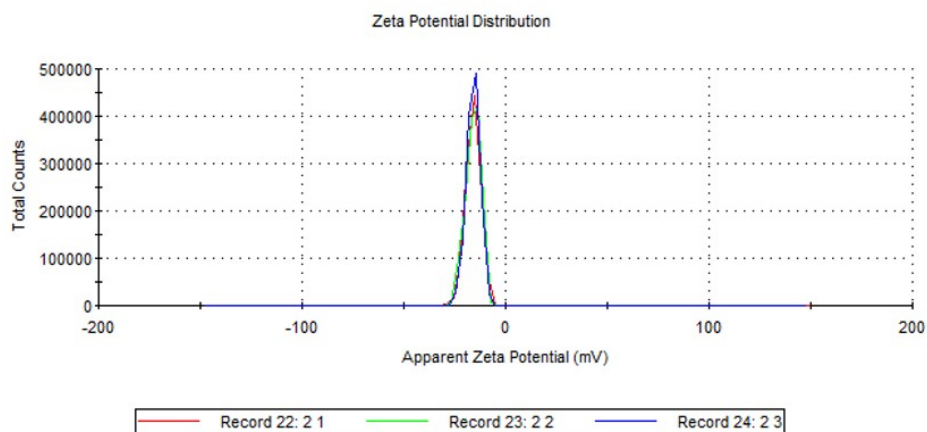


Figura 21. Diagrama de distribución del potencial zeta para las NPs de Ag de la cepa D204 a 37°C

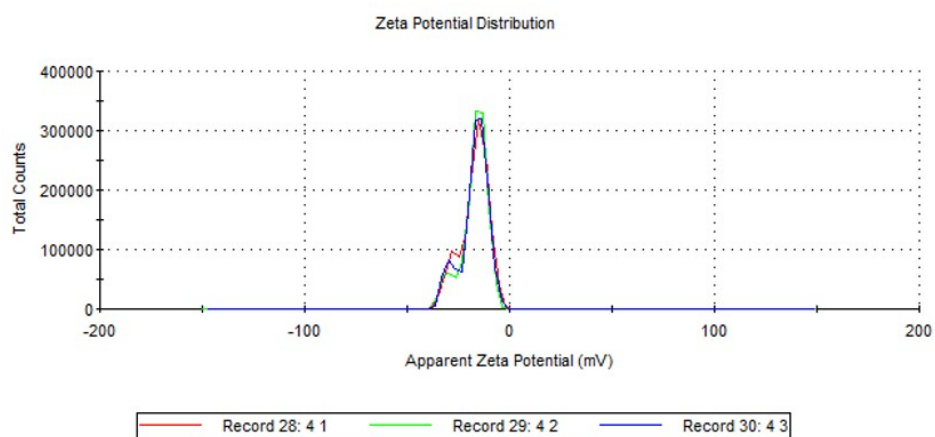


Figura 22. Diagrama de distribución del potencial zeta para las NPs de Ag de la cepa F121 a 20°C

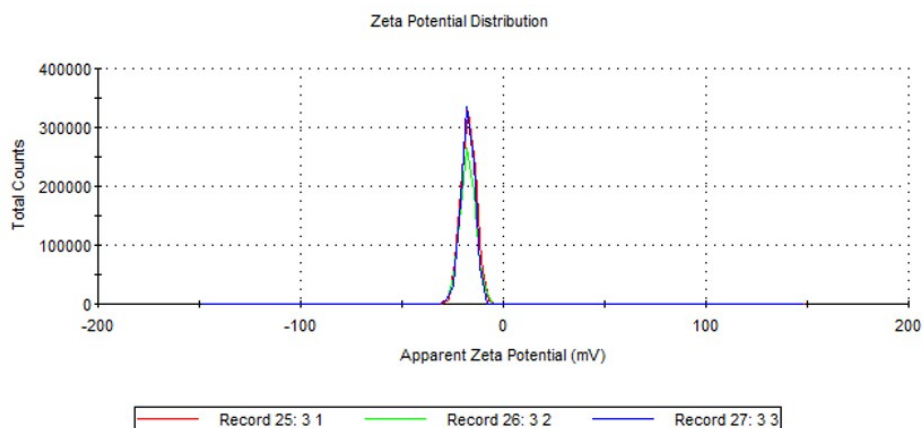


Figura 23. Diagrama de distribución del potencial zeta para las NPs de Ag de la cepa E404 a 20°C

4.3.4. HR-TEM

Mediante HR-TEM se determinó el tamaño y la morfología de las AgNPs obtenidas a partir de las cepas mencionadas. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 24 y el tamaño se determinó mediante el uso del software Image J.

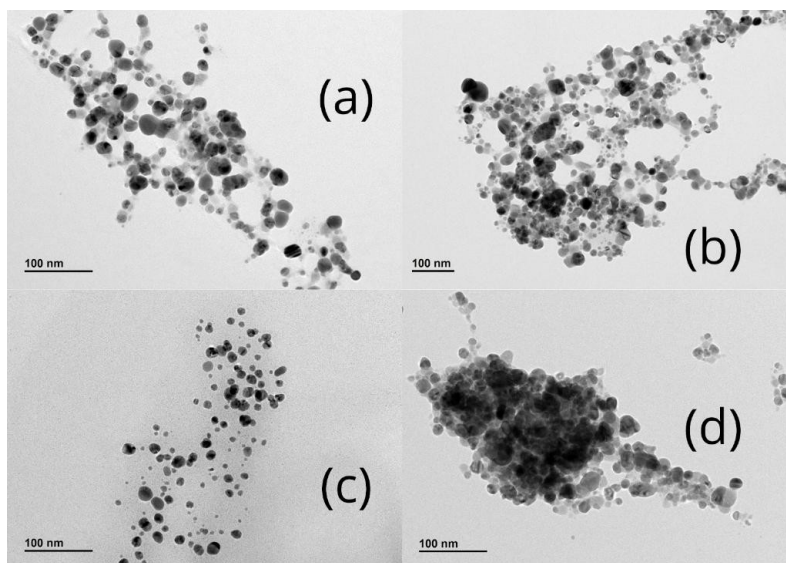


Figura 24. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) para las AgNPs de las cepas: (a) E404 a 20°C, (b) D204 a 37°C, (c) F121 a 20°C y (d) D361 a 20°C

Con el software, se midieron manualmente 100 AgNPs a partir de las imágenes mostradas anteriormente. A partir de los valores obtenidos, se construyeron histogramas que representan la distribución de tamaños de las NPs. Además, se calculó el tamaño promedio ponderado para cada cepa. En las Figuras 25 a 28, se muestran los histogramas realizados, mientras que en la Tabla 4 se presentan los tamaños promedio ponderado junto con sus respectivas desviaciones estándar.

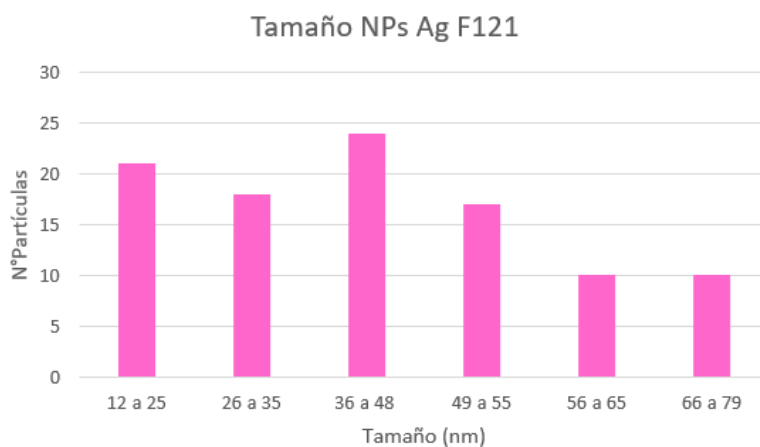


Figura 25. Histograma de distribución de tamaño para las AgNPs de la cepa F121 a 20°C

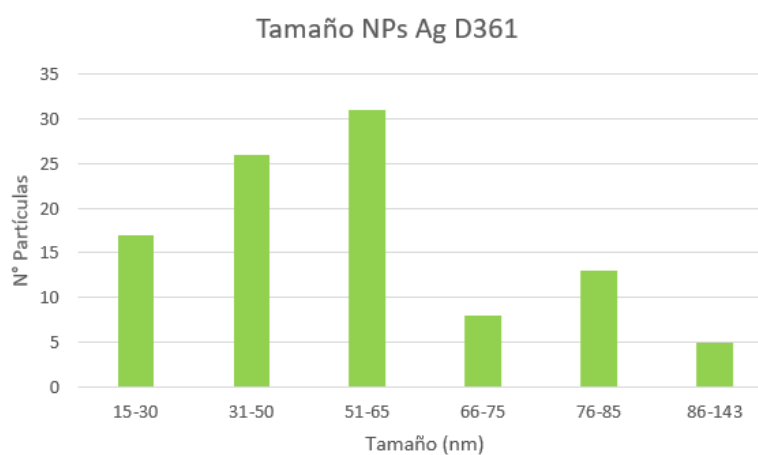


Figura 26. Histograma de distribución de tamaño para las NPs Ag de la cepa D361 a 20°C

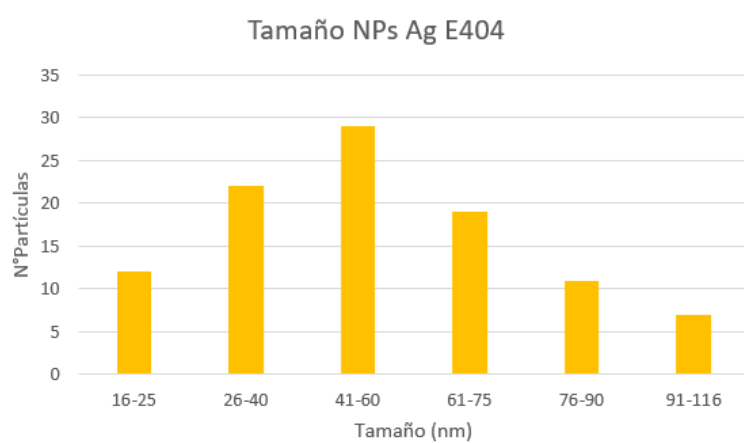


Figura 27. Histograma de distribución de tamaño para las NPs Ag de la cepa E404 a 20°C

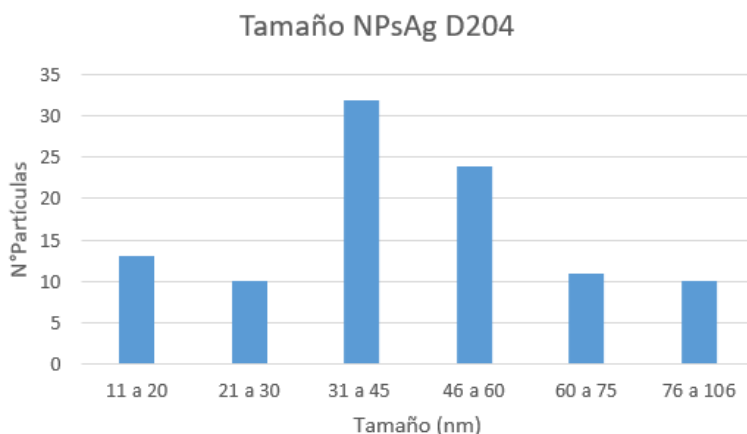


Figura 28. Histograma de distribución de tamaño para las NPs Ag de la cepa D204 a 37°C

Tabla 4. Rangos de distribución de tamaño y tamaños obtenidos por HR-TEM.

Cepa	Rango de distribución de tamaño (nm)	Promedio del tamaño \pm Desviación estándar (nm)
F121 20°C	12-79	41,44 \pm 16,28
D361 20°C	15-143	54,14 \pm 22,95
E404 20°C	16-116	53,32 \pm 22,68
D204 37°C	11-106	45,33 \pm 20,48

De acuerdo con los histogramas obtenidos y los promedios calculados, se observó que las AgNPs de la cepa F121 presentaron una distribución de tamaño más estrecha, con NPs que oscilan entre 12 y 79 nm (Figura 25). Este comportamiento se reflejó en un menor promedio, sugiriendo que estas NPs podrían ser de menor tamaño en comparación con las sintetizadas por el resto de las cepas. En contraste, las AgNPs de la cepa D361 mostraron una distribución de tamaño más amplia (NPs entre 15 y 143 nm) y un promedio mayor. (Figura 26). En todos los casos, se constató que el rango de tamaños con mayor cantidad de AgNPs medidas coincidió con el valor del promedio.

En términos de morfología, en todas las cepas evaluadas se observaron AgNPs esféricas, como se muestra en la Figura 29, que presenta las micrografías obtenidas por HR-TEM con una mayor magnificación con respecto a las micrografías anteriores, permitiendo apreciar con mayor detalle la forma y el tamaño de las NPs. Los resultados coinciden con las observaciones reportadas en estudios previos (Balakumaran et al., 2015; Da Costa et al., 2025; El deeb et al., 2025; Estevez et al., 2021; Sarsar et al., 2015; Singh et al., 2014; Othman et al., 2019), que describen la obtención de AgNPs esféricas utilizando hongos.

Al comparar los resultados del presente estudio con algunos reportes previos, se observa que las AgNPs obtenidas en este trabajo presentan tamaños promedio superiores a los informados en la literatura por análisis de TEM. Por ejemplo, Estevez et al. (2021) reportaron un tamaño promedio de 22 ± 6 nm determinado por TEM; mientras que Balakumaran et al. (2015) informaron una distribución de tamaños entre 5 y 30 nm de diámetro a partir del análisis de 150 AgNPs seleccionadas al azar en imágenes HR-TEM. De manera similar, Singh et al. (2014) reportaron que el tamaño de partícula de las AgNPs sintetizadas por *Penicillium* sp. oscilaba entre 25 y 30 nm; y

Othman et al. (2019) observaron diámetros entre 10 y 34 nm. Las imágenes obtenidas mostraron algunas partículas de plata individuales, además de algunos agregados con distintos rangos de tamaño, en contacto indirecto para asegurar la estabilización de las NPs mediada por agentes de recubrimiento (Othman et al., 2019).

Por otro lado, el tamaño promedio de AgNP@Fo VR039 medido por TEM fue de $24,5 \pm 3,7$ nm, según lo reportado por Da Costa et al. (2025). Asimismo, El deeb et al. (2025) mencionaron que las AgNPs parecen ser discretas y no agregadas, lo que sugiere una buena estabilidad coloidal.

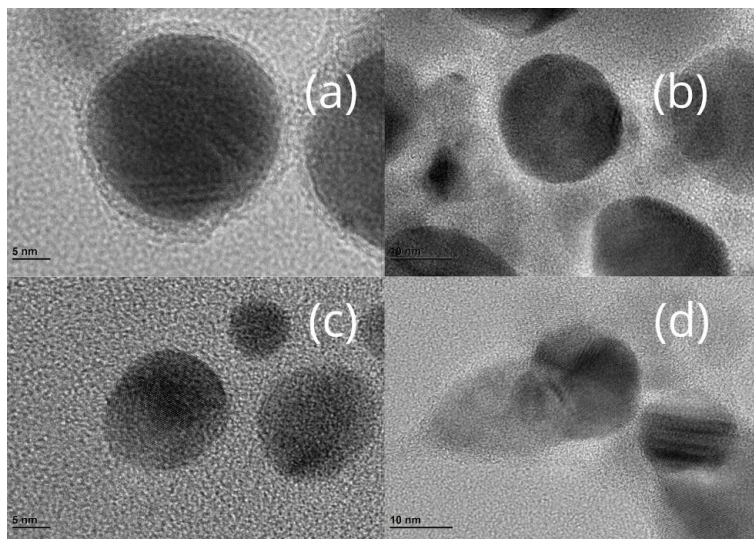


Figura 29. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) a mayor escala para las NPs Ag de las cepas: (a) E404 a 20°C, (b) D204 a 37°C, (c) F121 a 20°C y (d) D361 a 20°C.

4.3.4.1. EDS

La presencia del elemento plata (Ag) en las NPs sintetizadas fue confirmada a través del EDS acoplada al HR-TEM. En la Figura 30 se muestran los espectros correspondientes a las cepas analizadas, mientras que en la Tabla 5 se detallan los porcentajes de composición elemental obtenidos.

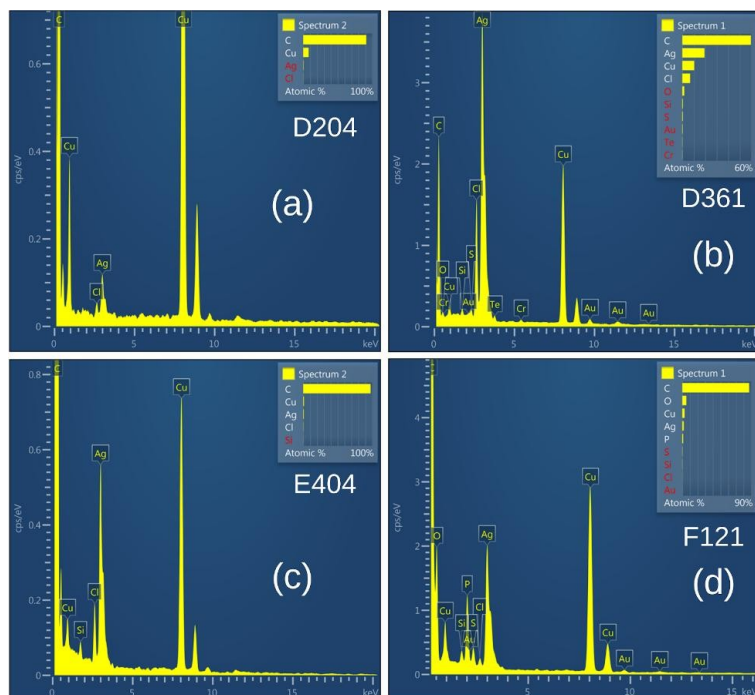


Figura 30. Imágenes obtenidas por Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) acoplado a HR-TEM para las NPs Ag de las cepas: (a) D204 a 37°C, (b) D361 a 20°C, (c) E404 a 20°C y (d) F121 a 20°C.

Tabla 5. Composición elemental de las AgNPs sintetizadas, determinada mediante EDS.

Elemento	Wt \pm Wt sigma (%) (porcentaje en peso \pm desviación estándar)			
	D204 37°C	D361 20°C	E404 20°C	F121 20°C
Ag	2,74 \pm 0,31	53,92 \pm 0,59	6,46 \pm 0,26	13,66 \pm 0,28
C	66,69 \pm 0,60	18,55 \pm 0,58	87,38 \pm 0,30	64,49 \pm 0,38
Cl	0,24 \pm 0,07	6,27 \pm 0,17	0,57 \pm 0,05	0,15 \pm 0,04
Cu	30,32 \pm 0,54	17,15 \pm 0,28	5,44 \pm 0,13	12,39 \pm 0,16
O		0,73 \pm 0,18		5,30 \pm 0,16
P				2,44 \pm 0,10

A partir del análisis EDX, se confirmó la presencia del elemento plata (Ag) en todas las NPs obtenidas. La presencia de Cu puede atribuirse a la composición de la rejilla utilizada para depositar las muestras. Las cepas D361 y F121 mostraron una mayor abundancia relativa de Ag en comparación con D204 y E404. Además, se encontraron otros elementos, como carbono (C), cloro (Cl), fósforo (P) y oxígeno (O).

Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Balakumaran et al. (2015), quienes confirmaron la presencia de picos correspondientes a la Ag en un medio optimizado, junto con otras señales como C, y Cl. De acuerdo con los autores, estas señales adicionales podrían deberse a la presencia de enzimas o proteínas presentes en el extracto fúngico. Por otra parte, Chan y Don (2013) demostraron que *Pycnoporus sanguineus* tuvo la mayor capacidad para sintetizar AgNPs en comparación con *Schizophyllum commune*, mostrando en el análisis elemental 28,21% y 22,81% de Ag, respectivamente. Los autores también detectaron señales de C, O, y Cl en sus espectros, probablemente atribuido a componentes provenientes de los hongos, hallazgos consistentes con los observados en el presente trabajo. Asimismo, Da Costa et al. (2025) realizaron un análisis detallado de los componentes elementales cerca de la superficie de las AgNPs mediante EDX. Según sus resultados, el carbono fue el elemento más abundante en los coloides, proveniente del extracto fúngico utilizado en la biosíntesis de AgNP@Fo.

4.3.5. Comparación del tamaño de las AgNPs obtenidas mediante HR-TEM y DLS.

Luego de caracterizar las AgNPs por separado mediante las técnicas de DLS y HR-TEM, se compararon los valores de tamaño obtenidos para comprender mejor las razones de las diferencias observadas.

Como puede observarse en la Tabla 6, los tamaños reportados por HRTEM se encuentran en un rango entre 41,44 y 54,14 nm, con desviaciones estándar moderadas, lo que indica una población de AgNPs relativamente homogénea. Esta técnica permite observar el diámetro del core de las NPs, sin considerar la capa de recubrimiento (*capping*) ni la capa de solvatación. A pesar de esto, los resultados obtenidos con esta técnica fueron similares a los obtenidos por DLS, a excepción de AgNPs de F121 que presentaron tamaños menores por DLS. Esto puede ser explicado por el procesamiento de las nanopartículas para TEM que deben estar totalmente secas; este tratamiento puede ocasionar aglomeración de varias nanopartículas que se visualicen como una única nanopartícula en las micrografías analizadas y por lo tanto resultan en un mayor tamaño que el tamaño real de la nanopartícula biogénica en suspensión (cómo se mide por DLS). Asimismo, la medida de DLS es representativa de todo el volumen de la muestra contenida en la celda, mientras que las micrografías obtenidas de TEM provienen de zonas puntuales (campos) de un depósito de muestra de volumen muy menor. Por otro lado, es importante destacar que se aplicaron diferentes criterios para reportar los tamaños de las AgNPs. En HR-TEM, se calcularon los promedios ponderados, que asignan distintos grados de importancia de acuerdo a la frecuencia o relevancia de los datos dentro de un conjunto (Ganti, 2024); mientras que en DLS se reportó el parámetro D50, conocido como el percentil 50 o mediana, que indica el tamaño al cual se encuentra el 50% de la muestra (Microtrac, s.f.).

Tabla 6. Comparación de los tamaños obtenidos de las AgNPs mediante HR-TEM y DLS.

Cepa	HR-TEM (nm)	DLS (nm)
D204 37°C	45,33 ± 20,48	57,3 ± 13,1
D361 20°C	54,14 ± 22,95	49,0 ± 10,9
E404 20°C	53,32 ± 22,68	47,8 ± 11,4
F121 20°C	41,44 ± 16,28	28,5 ± 1,45

En conjunto, estos resultados evidencian que las diferencias en los tamaños reportados están relacionadas tanto con los principios físicos de cada técnica como en el método utilizado para informar los valores promedio. Por lo tanto, el uso de estas metodologías complementarias permite una caracterización más completa y precisa de las AgNPs sintetizadas.

5. Conclusiones y Perspectivas

Se sintetizaron AgNPs a partir de cuatro cepas de hongos provenientes de la Antártida, evaluando la incidencia de distintas condiciones de reacción, tales como el tiempo (0, 24, 48 y 72 h), la temperatura (20 y 37°C) y la concentración del AgNO_3 (5 y 10 mM). Todas las cepas demostraron capacidad para producir AgNPs, observándose mayoritariamente un mayor rendimiento a 20°C y con una concentración de 10 mM de AgNO_3 .

Luego de la purificación por centrifugación, las AgNPs mostraron un aumento en la intensidad del pico correspondiente a la RPS, en comparación con el espectro obtenido a las 72 horas de síntesis, lo que evidencia que se logra purificar y concentrar las nanopartículas manteniendo su estabilidad coloidal. No obstante, las AgNPs producidas por la cepa D204 a 20°C presentaron una disminución de la intensidad en el pico de la RPS, indicando una pérdida en la estabilidad. Además, los análisis de estabilidad coloidal indicaron que las AgNPs obtenidas son estables frente a variaciones de pH y fuerza iónica.

Las técnicas de caracterización empleadas permitieron determinar la forma, el tamaño y la carga superficial. Las AgNPs presentaron morfología esférica, con tamaños promedio variables según la cepa utilizada, confirmados mediante HR-TEM y DLS. Los valores de potencial zeta reflejaron una estabilidad moderada, con cargas superficiales negativas, y el análisis por EDS permitió confirmar la presencia del elemento Ag, así como otros elementos provenientes del filtrado fúngico, como lo reportado para AgNPs biogénicas.

Estos resultados demuestran que la síntesis biológica de AgNPs mediada por hongos antárticos permite obtener nanopartículas estables y en grandes cantidades, sin necesidad de emplear reactivos tóxicos ni requerir de elevados consumos energéticos, lo que refuerza la viabilidad de este enfoque como una alternativa sostenible.

En futuras investigaciones, se puede ampliar el estudio a otras cepas antárticas para explorar nuevas capacidades biosintéticas, así como optimizar otras condiciones de reacción, como el pH o la concentración de la biomasa fúngica. También sería pertinente utilizar otras técnicas de caracterización para profundizar en el análisis estructural y superficial de las AgNPs, así como evaluar su actividad antimicrobiana y citotóxica, con el objetivo de valorar su eficacia y seguridad en posibles aplicaciones biotecnológicas.

6. Referencias

- Abdel-Rahim, K., Mahmoud, S.Y., Ali, A.M., Almaary, K.S., Mustafa, A. E. Z. M.A., Husseiny, S.M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Sci. 24, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N. A., & Walia, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Industrial Crops and Products*, 55, 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.026>
- Alborés, S., Estevez, M. B., Raffaelli, S., & Sanguineto, P. (2023) Microbial Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. *Chapter*.
- Ashizawa, K. (2019). Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS). *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 139(2):237-248. <https://doi.org/10.1248/yakushi.18-00171-1>
- Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., & Kalaichelvan, P. T. (2015). Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their in vitro biological activities. *Microbiological Research*, 178, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.009>
- Ballottin, D., Fulaz, S., Souza, M. L., Corio, P., Rodrigues, A. G., Souza, A. O., Gaspari, P.M., Gomes, A. F., Gozzo, F., & Tasic, L. (2016). Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1538-y>
- Banu, A. N., & Balasubramanian, C. (2014). Optimization and synthesis of silver nanoparticles using *Isaria fumosorosea* against human vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 113(10), 3843–3851. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4052-0>
- Birla, S. S., Gaikwad, S. C., Gade, A. K., & Rai, M. K. (2013). Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/796018>
- Carrasco, M., Rozas, J. M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-251>
- Chan, Y. S., & Don, M. M. (2013). Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. *Materials Science and Engineering C*, 33(1), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.041>
- Clínica Universidad de Navarra (s.f). *Sulfadiazina*, Plata. <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/sulfadiazina-plata#:~:text=La%20sulfadiazina%20arg%C3%A9ntica%20es%20un,la%20propagaci%C3%B3n%20de%20la%20infecci%C3%B3n>.

- Da Costa, T. S., Delgado, G. G., Braga, C. B., & Tasic, L. (2025). Insights into the fungal secretomes and their roles in the formation and stabilization of the biogenic silver nanoparticles. *RSC advances*, 15(9), 6938-6951. <https://doi.org/10.1039/D4RA07962K>
- Darroudi, M., Ahmad, M. B., Abdullah, A. H., & Ibrahim, N. A. (2011). Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 569–574. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16867>
- Dinger, D. (2006). Medidas de pontos isoelétricos sem o uso de analisador de potencial zeta. *Cerâmica Industrial*, 11(3), 23-24.
- Du, L., Xu, Q., Huang, M., Xian, L., & Feng, J. X. (2015). Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*, 160, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.04.003>
- Durán, N., Fávaro, W. J., Alborés, S., Da Costa, T. S., & Tasic, L. (2023). Biogenic Silver Nanoparticles Capped with Proteins: Timed Knowledge and Perspectives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230062>
- Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., & Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0028-1>
- El Deeb, B. A., Faheem, G. G., & Bakhit, M. S. (2025). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Talaromyces funiculosus* for therapeutic applications and safety evaluation. *Scientific Reports*, 15(1), 13750. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95899-7>
- Elizondo Hernández, D. A., Loya Herrera, A.A., Martínez Irastorza, P., Zamudio De La Cruz, E. (2021) Síntesis química vs síntesis biológica: la toxicidad de las nanopartículas de plata en relación con su origen. *Revista Naturaleza y Tecnología*. 37-78. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/6432>
- Estevez, M. B., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2019). Biogenic silver nanoparticles: Understanding the antimicrobial mechanism using Confocal Raman Microscopy. *Materials Research Express*, 6(12). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6636>
- Estevez, M. B., Raffaelli, S., Mitchell, S. G., Faccio, R., & Alborés, S. (2020). Biofilm eradication using biogenic silver nanoparticles. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092023>
- Estevez, M. B., Casaux, M. L., Fraga, M., Faccio, R., & Alborés, S. (2021). Biogenic Silver Nanoparticles as a Strategy in the Fight Against Multi-Resistant *Salmonella enterica* Isolated From Dairy Calves. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.644014>
- Estevez, M. B. (2024). *Biosíntesis de nanopartículas de plata: caracterización y evaluación de su potencial antimicrobiano*. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Química.

- Flores, C. Y. (2014). *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida*. Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata (Argentina). Facultad de Ciencias Exactas. <https://doi.org/10.35537/10915/34946>
- Franco, Rafael. (4 de abril de 2021). *Qué es el estrés oxidativo y cómo afecta al envejecimiento*. *The Conversation*. <https://theconversation.com/que-es-el-estres-oxidativo-y-como-afecta-al-envejecimiento-156156>
- Ganti, A. (8 de octubre de 2024). *Weighted average: What it is and how it's calculated*. *Investopedia*. <https://www.investopedia.com/terms/w/weightedaverage.asp>
- Guilger-Casagrande, M. & Lima, R. (2019) Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:287. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00287>
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Carvalho, L., Fraceto, L. F., & De Lima, R. (2021). Influence of the capping of biogenic silver nanoparticles on their toxicity and mechanism of action towards *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00797-5>
- Hassan Afandy, H., Sabir, D. K., & Aziz, S. B. (2023). Antibacterial Activity of the Green Synthesized Plasmonic Silver Nanoparticles with Crystalline Structure against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Nanomaterials*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nano13081327>
- Husseiny, S. M., Salah, T. A., & Anter, H. A. (2015). Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(3), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., & Viswanathan, B. (2011). Green synthesis of silver nanoparticles using *Polyalthia longifolia* leaf extract along with D-sorbitol: Study of antibacterial activity. *Journal of Nanotechnology*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2011/152970>
- Khalil, M., N. (2013). Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *Aspergillus fumigatus*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(50), 5645–5651. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6429>
- Kobashigawa, J. M., Robles, C. A., Gaiser, R. F., Schinca, D. C., Scaffardi, L. B., & Carmarán, C. C. (2023). Mycosynthesis of silver nanoparticles using psychrotrophic strains of *Tulasnella albida* Bourdot & Galzin from the South Orkney Islands (Antarctica). *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.04.004>
- Korbekandi, H., Ashari, Z., Iravani, S., & Abbasi, S. (2013). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3), 289–298.
- Kowkabany, G., & Bao, Y. (2024). Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles. *Molecules*, 29(19), 4672. <https://doi.org/10.3390/molecules29194672>

- Mayoral, J. B., Moreno, A. C., & Martínez, E. S. M. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 19.
- Lahiri, D., Nag, M., Sheikh, H. I., Sarkar, T., Edinur, H. A., Pati, S., & Ray, R. R. (2021). Microbiologically-Synthesized Nanoparticles and Their Role in Silencing the Biofilm Signaling Cascade. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636588>
- Leyva Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación En Discapacidad*, 2(1), 18–22. Retrieved from www.medigraphic.org.mx
- Mendoza Ramírez, M. C., & Avalos Borja, M. (2020). Nanoestructuras y su caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión; ciencia y arte. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 13(25), 61–78. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69630>
- Mendoza Uribe, G., & Rodríguez López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos*, 14(29), 161–186. <https://doi.org/10.18504/pl1429-161-2007>
- Miao, L. L., Hou, Y. J., Fan, H. X., Qu, J., Qi, C., Liu, Y., Li, D. F., & Liu, Z. P. (2016). Molecular structural basis for the cold adaptedness of the psychrophilic β -glucosidase BglU in *Micrococcus antarcticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2021–2030. <https://doi.org/10.1128/AEM.03158-15>
- Microtrac. (s.f.). *Distribución del tamaño de partículas*. <https://www.microtrac.es/es/base-de-datos-de-conocimientos/distribucion-del-tamano-de-particulas/>
- Mohammed Fayaz, A., Balaji, K., Kalaichelvan, P. T., & Venkatesan, R. (2009). Fungal based synthesis of silver nanoparticles-An effect of temperature on the size of particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.002>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Naito, M., Yokoyama, T., Hosokawa, K., & Nogi, K. (2018). Nanoparticle Technology Handbook. Nanoparticle Technology Handbook (pp. 1–877). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s1748-0132\(07\)70119-6](https://doi.org/10.1016/s1748-0132(07)70119-6)
- Nayak, R. R., Pradhan, N., Behera, D., Pradhan, K. M., Mishra, S., Sukla, L. B., & Mishra, B. K. (2011). Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: The process and optimization. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3129–3137. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0208-8>
- Nie, P., Zhao, Y., & Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114636>
- Nowak, T. J. (June 30, 2017). *Tripolide Is A Potential Advanced Prostate Cancer Treatment*. *Cancer ABCs*. <https://www.cancerabcs.org/advanced-prostate-cancer-blog/2017/6/30/zz1431bfsq8bkw3wkoei5xhrlswxzb>

- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Al-Balakocy, N. G., Hassan, M. M., & Elshafei, A. M. (2019). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0008-1>
- Parthiban, E., Manivannan, N., Ramanibai, R., & Mathivanan, N. (2019). Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. *Biotechnology Reports*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00297>
- Phanjom, P., & Ahmed, G. (2017). Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(4). <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa92bc>
- Qian, Y., Yu, H., He, D., Yang, H., Wang, W., Wan, X., & Wang, L. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1613–1619. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0937-z>
- Rai, M., Ingle, A. P., Trzcińska-Wencel, J., Wypij, M., Bonde, S., Yadav, A., Kratošová, G., & Golińska, P. (2021). Biogenic silver nanoparticles: What we know and what do we need to know? *Nanomaterials*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano11112901>
- Rupanshi, Kumar, V., Yadav, N., Singh, D., Beniwal, V., Chhabra, J., & Singh, B. (2025). Biogenic Silver Nanoparticles as Next-Generation Green Catalysts for Multifaceted Applications. *Transactions of Tianjin University*, 1-34. <https://doi.org/10.1007/s12209-025-00427-3>
- Salwom, L., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Shariff, F. M., Convey, P., Pearce, D., & Ali, M. S. M. (2019). Isolation, characterisation, and lipase production of a cold-adapted bacterial strain *Pseudomonas* sp. LSK25 isolated from Signy Island, Antarctica. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040715>
- Sanguiñedo, P., Fratila, R. F., Estevez, M. B., Martínez de la Fuente, J., Grazú, V., & Alborés, S. (2018). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. *Nano Biomed. Eng.*, 10(2): 165-173.
- Sanguiñedo, P., Estevez, M. B., Faccio, R., & Alborés, S. (2019). Nanopartículas de plata biogénicas a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens* para el control de microorganismos. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 12(22), 99-108. <http://dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.67627>
- Sanguiñedo, P., Faccio, R., Abreo, E., & Alborés, S. (2023). Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: Potential Antifungal Agents in Rice and Wheat Crops. *Chemistry (Switzerland)*, 5(4), 2104–2119. <https://doi.org/10.3390/chemistry5040143>
- Santos, A., Troncoso, C., Lamilla, C., Llanquinao, V., Pavez, M., & Barrientos, L. (2017). Nanopartículas Sintetizadas por Bacterias Antárticas y sus Posibles Mecanismos de Síntesis. *International Journal of Morphology*, 35(1), 26-33. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100005>

- Sarsar, V., Selwal, M. K., & Selwal, K. K. (2016). Biogenic synthesis, optimisation and antibacterial efficacy of extracellular silver nanoparticles using novel fungal isolate *Aspergillus fumigatus* MA. *IET Nanobiotechnology*, 10(4), 215–221. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0058>
- Saxena, J., Sharma, P. K., Sharma, M. M., & Singh, A. (2016). Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2558-x>
- Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., Abdullah, R., Sharif, S., Naz, S., Saleem, F., Aihetasham, A. and Chaudhary, A. (2019). Size-Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely Antibacterial and Cytotoxic Effects. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>
- Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., & Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial Pathogenesis*, 93, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.014>
- Singh, D., Rathod, V., Ningnanagouda, S., Hiremath, J., Singh, A. K., & Mathew, J. (2014). 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*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/408021>
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., Van Der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 741–749. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2032-6>
- Sivera, M., Kvitek, L., Soukupova, J., Panacek, A., Pucek, R., Vecerova, R., & Zboril, R. (2014). Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103675>
- Tibaquirá, J. E., Moran, J., Otanicar, T., & Posner, J. D. (2007). Mediciones de potencial zeta de microesferas de vidrio en glicol de etileno y en soluciones tampón de fosfato. *Scientia et technica*, 1(35).
- Villafuerte R., L., García F., B., Garzón S., M. D. L., Hernández L., A., & Vázquez R., M. L. (2008). Solid lipid nanoparticles | Nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(1), 38–52.
- Xue, B., He, D., Gao, S., Wang, D., Yokoyama, K., & Wang, L. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1899–1906. <https://doi.org/10.2147/IJN.S98339>
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>