



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**HIDROGELES - NANOCOMPOSITOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA  
MÉDICA**

**AUTORAS: SOLANGE FARÍAS GUTIERREZ, JOSETTE FUENTES NAVARRO  
PROFESOR GUÍA: DR. JOHN AMALRAJ, M. Sc., Ph. D.  
PROFESORA CO-GUÍA: T.M DRA. VERÓNICA CARRASCO-SANCHEZ**

**Talca-Chile  
2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

***Dedicatoria***

*A mis padres y hermana por el apoyo y cariño incondicional brindado durante todo este proceso.*

*- Josette*

*A mis abuelos, padres, hermanas y amigos los cuales se mantuvieron a mi lado en todo este proceso de mi vida, dando su apoyo incondicional, clave para poder llegar a este punto de mi vida.*

*- Solange*

## ***Agradecimientos***

*En primer lugar, agradecemos a nuestro profesor guía Dr. John Amalraj por darnos la oportunidad de trabajar este proyecto, al igual que a nuestra profesora co-guía Dra. Verónica Carrasco-Sánchez quienes nos orientaron y estuvieron disponible para resolver nuestras dudas, compartiendo nuestras frustraciones y logros a lo largo de este camino. Agradecemos a cada persona que nos recibieron y ayudaron, tanto en el instituto de química, como en el departamento de microbiología de la Escuela de Tecnología Médica. Queremos destacar al Dr. Ram por su apoyo en la primera fase experimental de nuestra Memoria.*

*Por todas risas, apoyo y contención por parte de nuestros amigos, amigas y familiares que gracias a ellos logramos llegar a este punto de nuestra vida.*

## INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1. METALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	4
2.2. PLATA .....	6
2.3. NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AGNP).....	9
2.3.1. <i>Categorías de síntesis de nanopartículas</i> .....	10
2.3.2. <i>Ventajas del uso de nanopartículas en comparación con los antibióticos.</i> ..	13
2.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PLATA .....	13
2.4.1. <i>Adhesión de las nanopartículas de plata en la pared y membrana celular</i>	14
2.4.2. <i>Penetración de las nanopartículas de plata dentro de la célula y</i> <i>desestabilización de estructuras intracelulares y biomoléculas</i> .....	15
2.4.3. <i>Toxicidad celular inducida por AgNP y estrés oxidativo</i> .....	16
2.4.4. <i>Modulación de vías de transducción de señales</i> .....	16
2.5. RESISTENCIA A LA PLATA .....	19
2.6. JENGIBRE.....	20
2.7. HIDROGELES.....	21
2.7.1. <i>Síntesis de hidrogeles</i> .....	21
2.7.2. <i>Clasificación de los hidrogeles</i> .....	25
2.7.3. <i>Funciones de hidrogeles</i> .....	28
2.7.4. <i>Hidrogeles de alginato de sodio</i> .....	29
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.....	36
4.2. SÍNTESIS DE HIDROGEL DE ALGINATO DE SODIO .....	36
4.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	37
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	38

4.4.1.	<i>Espectro UV-visible de síntesis de nanopartículas de plata</i> .....	38
4.4.2.	<i>Espectroscopía infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR)</i> .....	39
4.5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	39
4.5.1	<i>Screening de susceptibilidad antibacteriana</i> .....	39
4.5.2	<i>Estudio cuantitativo de actividad antibacteriana</i> .....	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
5.1	ESPECTROSCOPÍA INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	42
5.2	ESPECTRO UV-VISIBLE DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS .....	43
5.3	SCREENING DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	44
5.4	RECuento bacteriano con el método de punto final. ....	44
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>52</b>
8.1.	ANEXO 1: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO (UFC/mL) .....	52
8.2.	ANEXO 2: SWELLING RATIO.....	53
8.3.	ANEXO 3: CONTROLES ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	54
8.4.	ANEXO 4: PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN HIDROGELES DE AS.....	55
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>56</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de preparaciones que utilizan plata acorde a Farmacopea Británica, 2012....	8
<b>Tabla 2.</b> Esquema de síntesis de hidrogeles con alginato de sodio.....	36
<b>Tabla 3.</b> Esquema de trabajo para prueba de actividad antimicrobiana .....	41
<b>Tabla 4.</b> Recuento de colonias en Placa Agar Soya a las 24 horas de ser sembradas, incubadas a 37°C y porcentaje de inhibición comparado con el estándar 0,5 McFarland...	44
<b>Tabla 5.</b> Actividad antibacteriana de los hidrogeles con nanopartículas de plata frente a las bacterias: <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , todos con dilución $10^{-1}$ .....	45
<b>Tabla 6.</b> Cálculo de Swelling ratio de cada hidrogel sintetizado.....	53
<b>Tabla 7.</b> Controles de cultivo bacteriano del método de estudio cuantitativo de la actividad antimicrobiana.....	54

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Las cuatro rutas más destacadas de acción antimicrobiana de las AgNP .....	17
<b>Figura 2.</b> Las acciones antibacterianas de las nanopartículas de plata (AgNP).....	18
<b>Figura 3.</b> Síntesis de hidrogeles .....	23
<b>Figura 4.</b> Monómeros del ácido algínico. ....	29
<b>Figura 5.</b> Bloques poliméricos de ácido manurónico y ácido gulurónico.....	31
<b>Figura 6.</b> Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) .....	42
<b>Figura 7.</b> Espectro UV-Visible de los diferentes compuestos. ....	43
<b>Figura 9.</b> HAgNP-1 .....	55
<b>Figura 10.</b> HAgNP-2 .....	55
<b>Figura 11.</b> HAgNP-3 y HC3 .....	55

## RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNP) con actividad antimicrobiana por medio de síntesis verde, utilizando extracto de jengibre (*Zingiber officinale*) como agente reductor de las nanopartículas de plata provenientes de una solución de AgNO<sub>3</sub> en presencia de polímeros hidrosolubles y biocompatibles.

Los hidrogeles desarrollados estaban compuestos por polímeros naturales (Alginato de sodio) y sintéticos (acrilamida y acrilato de sodio) formando una red semi-interpenetrante de acrilamida y acrilato de sodio, este se sintetizó mediante copolimerización en plantilla en presencia de alginato de sodio como una matriz y N,N, metilen-bisacrilamida (MBA) como agente de reticulación. Finalmente, para llevar a cabo una reticulación química, se necesitó de un iniciador (persulfato de potasio) para formar enlaces covalentes en la estructura tridimensional del hidrogel.

Las AgNP obtenidas se analizaron mediante espectroscopía UV-Vis y FTIR para determinar su formación. El estudio FTIR demostró que existían grupos funcionales hidroxilo en el extracto que reducían Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup>. La actividad antibacteriana de AgNP se investigó contra *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* mediante el recuento bacteriano en placas de agar soya- tripticasa con el método de punto final. Las AgNP mostraron un efecto antimicrobiano con una inhibición sobre el 99% de todas las bacterias estudiadas. Los resultados mostraron que el hidrogel con menor cantidad de alginato de sodio con respecto a acrilamida-acrilato de sodio tenía una mejor capacidad para suprimir el crecimiento bacteriano en comparación con su contraparte. Estos resultados sugieren que las AgNP podrían usarse como un material antibacteriano efectivo y como alternativa frente a la creciente resistencia antimicrobiana.

**Palabras claves:** Alginato de sodio, nanopartícula de plata, hidrogel, actividad antimicrobiana, jengibre.

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido al aumento de la resistencia bacteriana a las distintas especies de desinfectante, químicos y antimicrobianos, se ha querido buscar una alternativa para combatir este creciente problema a nivel mundial. Una de estas opciones, que ha sido investigada en los últimos años, es la técnica de síntesis de hidrogeles, la cual abre la puerta para formar materiales con nanopartículas de metales que por sí solo presenten la actividad biocida.

El alginato de sodio (AS) es una macromolécula aniónica natural que es obtenida de algas marinas. Este es abundante, renovable, no tóxico, soluble en agua, biodegradable y biocompatible, debido a esto ha atraído la atención en la biomedicina.

Las nanopartículas metálicas alojadas en polímeros han sido de gran interés en la actualidad, ya que presentan aplicaciones en recubrimientos antimicrobianos. Es reconocido que las nanopartículas de plata presentan actividad biocida e inhibitoria para microorganismos, a través de distintos mecanismos de acción como: unión al ADN bacteriano, inactivación de enzimas metabólicas que participan en la cadena transportadora de electrones, entre otros.

Se utilizó AgNP en hidrogeles de alginato de sodio, las cuales ha demostrado ser un componente antimicrobiano efectivo frente a múltiples microorganismos como hongos, virus y bacterias. Estas nanopartículas fueron realizadas utilizando extracto de jengibre (*Zingiber officinale*), donde al tratar la solución de AgNO<sub>3</sub> con este extracto resultó en la formación de nanopartículas de Ag<sup>0</sup>. Este método fue eficiente de acuerdo con su simplicidad y ventaja de ser química sostenible.

Finalmente, se estudió las características de las nanopartículas por medio de espectrofotometría UV-vis y FTIR. Además, se evaluó la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivo y Gram negativo.

## 2. MARCO TEÓRICO

A comienzos de la década de los años 1970, se comenzaron a observar bacterias, las cuales, presentaban resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis* (1). Lo cual llevo en la búsqueda de nuevos fármacos o formas de erradicar estos patógenos.

La resistencia a los antibióticos ha ido en aumento en todo el mundo, se ha visto un creciente número de infecciones, como neumonía, tuberculosis, septicemia, gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles de tratar, debido a la pérdida de eficiencia de los antibióticos que eran usados en su tratamiento (2). Algunas causas de esto es el uso de estos medicamentos sin receta médica para uso humano como animal, pacientes que no han acabado su tratamiento, control inadecuado de las infecciones en los hospitales y clínicas, falta de higiene y saneamiento deficiente, y falta de desarrollo de nuevos antibióticos (3). Para combatir esta problemática, se han investigado distintas opciones, entre ellos el desarrollo de la síntesis de hidrogeles con nanopartículas de distintos metales, los cuales poseen por sí solos actividad antimicrobiana.

### 2.1. Metales con actividad antimicrobiana

Los metales han sido utilizados desde la antigüedad por su actividad antimicrobiana. Ciertos metales no esenciales, como la plata ( $\text{Ag}^+$ ), el mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y el telurio ( $\text{TeO}_3^{2-}$ ), son extremadamente venenosos para la mayoría de las bacterias y tienen actividad microbicida a concentraciones excepcionalmente bajas (4). Algunos de los mecanismos de acción de los metales son: alteran las biopelículas resistentes a antibióticos, ejercen actividad bactericida sinérgica con otros biocidas, inhiben las vías metabólicas de manera selectiva y matan las bacterias resistentes a múltiples fármacos. Las dosis tóxicas de estos metales

interrumpen selectivamente los procesos necesarios para el crecimiento celular de una manera que está influenciada por las propiedades físicas y químicas, tanto de los átomos metálicos como de los ligandos donantes accesibles dentro de las biomoléculas intracelulares. Por lo tanto, las especies metálicas tienen un comportamiento predecible y participan en reacciones espacialmente localizadas o discretas que eliminan las actividades enzimáticas, interrumpen la función de la membrana o dañan el ADN (5).

Visto de otra perspectiva, la mayoría de los metales pesados son elementos de transición con orbitales *d* completamente rellenos. Estos orbitales *d* proporcionan cationes de metales pesados con la capacidad de formar compuestos complejos que pueden ser o no activos redox. En consecuencia, juegan un papel importante como "oligoelementos" en reacciones bioquímicas sofisticadas. Sin embargo, a concentraciones más altas, los iones de metales pesados forman compuestos complejos no específicos en la célula, lo que conduce a efectos tóxicos. Algunos cationes de metales pesados, por ejemplo:  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ag}^+$ , forman complejos tóxicos fuertes, lo que los hace demasiado peligrosos para cualquier función fisiológica. Incluso los oligoelementos de gran reputación como  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  y especialmente  $\text{Cu}^{2+}$  son tóxicos en concentraciones más altas (6).

El estrés oxidativo, las características fisiológicas y bioquímicas alteradas que conducen al daño orgánico ocurren con exposiciones a metales pesados. Los metales pesados imparten sus efectos toxicológicos principalmente a través de interacciones moleculares con grupos sulfhidrilo en diversas moléculas, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y debilitando el sistema de defensa antioxidante de las células y alterando el transporte de los canales de calcio y  $\text{Fe}^{2+}$  (7).

Estudios recientes indican que los metales de transición actúan como catalizadores en las reacciones oxidativas de las macromoléculas biológicas, por lo tanto, las toxicidades asociadas con estos metales podrían deberse al daño oxidativo del tejido.(8)

Se han realizado muchos esfuerzos e inversiones en la síntesis de nanopartículas mediante enfoques físicos y químicos, aunque son métodos fácilmente reproducibles y ampliamente disponibles presentan una cierta amenaza ambiental, por lo que, se ha buscado nuevas técnicas para su síntesis. Las nanopartículas metálicas generalmente se sintetizan de esta manera en un solo paso: un proceso de recipiente único donde el extracto orgánico / hongos / bacterias se agrega a la solución de sal metálica requerida y los iones metálicos se reducen y se cubren con varios compuestos orgánicos que implican la utilización de productos químicos no tóxicos, benignos disolventes en comparación con físicos o procesos químicos. Por lo tanto, se observa una menor huella de carbono con resultados satisfactorios (9).

## 2.2. Plata

El uso de la plata como agente microbiano, viene desde la antigüedad, usándose principalmente para la desinfección del agua. En el siglo XVII es descrito como producto medicinal con múltiples propósitos, entre ellos el tratamiento de las úlceras al estar como nitrato de plata; y a fines del siglo XIX es usado como solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en los recién nacidos (10), pero su uso en el campo antimicrobiano fue disminuyendo con el avance de los antibióticos. Antes del inicio de la terapia con antibióticos, se utilizaba la plata por su actividad antiséptica, principalmente para el tratamiento de quemaduras y de heridas (11).

Los productos de plata son comunes en el uso médico, dental y comercial como agentes microbiocidas. En los hospitales, su principal uso es en las salas de quemaduras, donde la sulfadiazina de plata y la tela de nylon impregnada de plata se usan como antisépticos. También, encontramos los catéteres de plata recubiertos con  $\text{Ag}^+$  los que son usados por su actividad antiséptica de liberación lenta (12). Igualmente, encontramos en su aplicación médica, las formulaciones de plata para uso externo (**ver tabla 1**).

La plata como agente antimicrobiano ha sido utilizado por cientos de años para el cuidado de heridas, para prevenir o manejar infecciones en distintas presentaciones. En estado sólido, como alambres de plata ubicados sobre las heridas; como soluciones de sales de plata, para limpiar las heridas; y como cremas o ungüentos conteniendo compuestos con antibióticos y plata, por ejemplo, crema con sulfadiazina de plata (SSD) (13). En la actualidad, se utiliza la plata iónica en un número significativo de vendajes. Se puede potenciar la actividad antimicrobiana de la plata iónica si lo combinamos con los polímeros apropiados, junto con el incremento de la cicatrización de las heridas, una mejora en la sustentabilidad, mejora del manejo de los fluidos y una disminución de la toxicidad (14). Chen y col. (2014), demuestran que los vendajes con AgNP pueden acelerar la curación en quemaduras superficiales, pero no habría diferencia en quemaduras profundas, comparado con sulfadiazina de plata al 1%. Esto apunta que las AgNP aceleran la reepitelización, pero no la angiogénesis (15).

**Tabla 1.** Lista de preparaciones que utilizan plata acorde a Farmacopea Británica, 2012 (Tabla extraída de Cardoso, 2016)

<b>Preparaciones</b>	<b>Usos</b>
Acetato de plata, borato de plata, alantoinato de plata y zinc, carbonato de plata, cloruro de plata, cromato de plata, glicerolato de plata, ioduro de plata coloidal, lactato de plata, manganita de plata, polímeros de nylon con plata.	Antiséptico (uso similar al nitrato de plata).
Nitrato de plata (1%)	Profilaxis de oftalmía gonocócica neonatal (conjuntivitis neonatal), verrugas, granulomas umbilicales, tejido de sobregranulación y cauterización.
Proteína de plata, plata coloidal	Antisepsia: gotas para los ojos y membranas mucosas.
Sulfadiazina de plata (1%)	Profilaxis y tratamiento de heridas por quemadura, su utilización como adyuvante en el tratamiento de corto plazo de las infecciones de úlceras en piernas y úlceras de decúbito, y también agregado a la profilaxis de las infecciones en sitios de donantes de injertos de piel y en abrasiones extensivas. Prevención y tratamiento de infecciones en quemaduras severas Tratamiento ocular de infecciones por <i>Aspergillus</i> .

### 2.3. Nanopartículas de plata (AgNP)

La fabricación de nanopartículas (NP) data de cientos de años atrás, por ejemplo, los colides de oro y plata en la copa de Licurgo del Imperio Romano (siglo IV). Según Cardoso (2016), la nanotecnología se define como la producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y tamaño de materiales en la escala nanométrica. Esta escala comprende el nivel atómico de alrededor de 0,2 nm hasta aproximadamente 100 nm. En el caso de la Nanomedicina, la aplicación de esta tecnología está en vista de realizar diagnóstico médico, tratamiento o prevención de enfermedades, aprovechando las propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas, y frecuentemente novedosas de los materiales en nanoescala (16).

Es reconocido que las nanopartículas de plata, oro y cobre son tóxicas para los microorganismos. Se ha demostrado que la plata de tamaño nano es el agente antibacteriano más efectivo por su amplio espectro biocida inhibitorio para microorganismos. Las AgNP (nanopartículas de plata) se unen al ADN bacteriano evitando que se multipliquen, asimismo provocan la inactivación de enzimas metabólicas que participan en la cadena transportadora de electrones, lo que desencadena la inactivación de la bacteria (16).

Los hidrogeles compuestos comprenden partículas de nano plata incrustadas en la matriz de hidrogel, a través de un proceso verde con extracto de hoja de menta, los cuales mostraron una clara actividad sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (17). Estudios muestran que la presencia de AgNP contribuyó a un mayor hinchamiento de los geles. Además, se ha observado que las AgNP se encuentran fuertemente unidas a la red de gel, lo que reduce las interacciones entre segmentos, haciendo que la red de gel sea más expandible (18).

El primer reporte de obtención de nanopartículas de plata es documentado en 1889, cuando M.C. Lea informa sobre la síntesis de plata coloidal estabilizada con citrato (tamaño promedio de las partículas obtenidas era de 7 a 9 nm). En 1953, Moudry patenta un producto con nanopartículas de plata estabilizadas en gelatina con un tamaño de 2 a 20 nm. En 1960, se introduce en el tratamiento de las quemaduras (10).

Es definido como Nanopartícula de plata a aquellas partículas con un tamaño entre 1 y 100 nm en al menos una dimensión (escala:  $10^{-9}$  m). Para su síntesis existen variados métodos, en los cuales conducen a tamaños, morfología, e incluso estabilidad variable. De forma general, se pueden clasificar en 3 categorías, dentro de las cuales encontramos los métodos de producción *top-down* (se va reduciendo el tamaño de las partículas) y *bottom-up* (a partir de átomos individuales se van formando ensambles).

### **2.3.1. Categorías de síntesis de nanopartículas**

- a) Síntesis física: Mientras que los métodos físicos *top-down* involucran usualmente la molienda o desgaste, enfriamiento repetido y la fotolitografía, las técnicas *bottom-up* comienzan con un precursor de sal de plata que es reducido en una reacción química. La nanoplata de producción comercial utilizan generalmente este último método. La evaporación/condensación y ablación con láser son las principales técnicas físicas para formar nanoplata desde muestras de metal (10).
  
- b) Síntesis química: Es el método más frecuente es la reducción química, utilizando para ello sal de plata, reductores y un estabilizador o agentes de terminación para controlar su crecimiento. La sal más habitualmente usada es el nitrato de plata, debido a su bajo costo y estabilidad química. En tanto, los estabilizadores

incluyen surfactantes y ligandos o polímeros que contienen grupos funcionales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato y otros (10).

- c) Síntesis biológica o verde: Es una síntesis orientada a ser amigable con el medio ambiente, en donde los agentes reductores y de terminación son ecológicos, como son los péptidos, carbohidratos, proteínas, varias especies de bacterias, hongos y levaduras, algas y plantas. Thomas y col. (2015), desarrollaron una solución económica para preparar films con nanopartículas de plata-quitosano a gran escala, utilizando quitosano como agente quelante y estabilizador; estos films muestran una acción antibacteriana excelente contra *Escherichia coli* y *Bacillus spp.* (14). El mecanismo de síntesis verde incluye la reducción enzimática, dentro de la cual encontramos a la reductasa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato dependiente, y la reducción no enzimática. Entre las ventajas de la síntesis biológica es la eliminación de los solventes orgánicos y reactivos tóxicos en el procedimiento, además las AgNP obtenidas son más estables que aquellas producidas químicamente, y pueden permanecer estables durante un largo período de tiempo. Por el contrario, las desventajas es que en el proceso de purificación puede llevar a que las bacterias patogénicas contaminen el producto, por lo que se debe tener precaución en su aplicación médica (10).

Las nanopartículas de plata a bajas concentraciones, no son tóxicas para el cuerpo humano, y además tienen acciones antibacterianas de amplio espectro (19). Se dice que los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) tienen actividad bactericida frente a varias bacterias de importancia clínica resistentes a antibióticos, incluida *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina. (19)

Esto los convierte en candidatos potenciales para su uso en productos farmacéuticos y su incorporación a dispositivos médicos como recubrimiento superficial (20) que pueden ayudar a prevenir transmisión de patógenos en el ambiente clínico (19), la adhesión y posterior formación de biofilm en los dispositivos médicos (20). También, se ha observado que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de inhibir la formación de biofilm (21).

El potencial antimicrobiano de la plata puede aumentar si se reduce el tamaño de las partículas. Desde un punto de vista estructural, en un rango de tamaño entre 10 – 100 nm, se observa un fuerte potencial bactericida frente a bacterias Gram positivo y Gram negativo (22). Y a medida que disminuye el tamaño de la partícula, la relación superficie-área/volumen aumenta considerablemente (23), resultando en una mayor reactividad (11). Es decir, las partículas pequeñas presentan mayor área de superficie disponible para la interacción, presentando un mayor efecto bactericida que las partículas grandes (11, 24). Las nanopartículas de plata (AgNP) con un tamaño inferior a 100 nm, contienen entre 10.000 y 15.000 átomos de plata. Estas tienen propiedades biológicas importantes, como ser agentes bactericidas efectivos frente a un amplio espectro de bacterias (11).

Existen diversos factores que afectan la susceptibilidad bacteriana a plata y AgNP, entre ellos se encuentran el aumento de temperatura o de pH alcalino, los cuales aumentan en forma modesta la actividad de la plata iónica (aunque se han descrito que algunas combinaciones como la sulfadiazina de plata son inestables a pH alcalino). Otra variable es la exposición a largo plazo, un ejemplo de esto es la acción de la plata en los tubos endotraqueales, en los cuales puede prevenir la formación de biofilm durante unos pocos días, pero no si se utiliza de forma prolongada. La matriz del polímero utilizado también puede afectar la liberación de la plata iónica (10).

### 2.3.2. Ventajas del uso de nanopartículas en comparación con los antibióticos

- a) Superar los mecanismos existentes de resistencia a los antibióticos: Esto es gracias a su tamaño ( $< 100$  nm), el cual le otorga propiedades novedosas, como mayor interacción con las células debido a una mayor relación superficie/masa (25), por esta misma razón se ha demostrado actividad antimicrobiana frente a biopelículas (26).
  
- b) Usar múltiples mecanismos antimicrobianas simultáneamente: El uso de nanopartículas tiene múltiples modos de acción, por lo que es poco probable que un microorganismo tenga resistencia a todos ellos, ya que es poco común tener múltiples mecanismos de resistencias o múltiples genes mutados (25, 27).
  
- c) Rol como portadores de antibióticos: Sus principales ventajas para el transporte de antimicrobianos son: el tamaño pequeño que puede combatir bacterias intracelulares y la capacidad de ingresar a través de endocitosis a las células del huésped; protección de los antibióticos frente a reacciones químicas perjudiciales y mecanismos de resistencia; precisión y seguridad reduciendo los efectos secundarios llevándolo a la ubicación deseada; controlabilidad del tiempo de liberación y combinación de antimicrobianos en la misma NP (25).

### 2.4. Mecanismo de acción de la plata

El mecanismo de acción de AgNP no está completamente claro, sin embargo, estos abarcan una amplia gama de procesos moleculares dentro de los microorganismos

(ver figura 4 y 5), que resulta en: Inhibición del crecimiento, pérdida de infectividad y muerte celular. Estos procesos dependen de la forma, tamaño y concentración de AgNP y de la susceptibilidad del microorganismo a la plata. (19)

Las AgNP son atractivas debido a su acción antibacteriana de amplio espectro y su baja toxicidad para el cuerpo humano en bajas dosis. Se sabe que los compuestos a base de plata, tienen efecto bactericida para microorganismos, incluidas las bacterias resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. (11, 24)

El mecanismo de acción de las AgNP, en general, se relaciona con su habilidad de generar mayor cantidad de plata iónica e incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno. Si comparamos a la plata iónica con las AgNP, el mecanismo de acción en la membrana es similar, sin embargo, las AgNP son más eficientes para una concentración en el rango de los nanogramos en comparación con el rango de microgramos para la plata iónica (16). Un factor importante es, que se requiere la presencia de humedad para la penetración de plata iónica dentro de la bacteria. (10). La acción antibacteriana de las nanopartículas de plata está relacionada con 4 mecanismos (28).

#### **2.4.1. Adhesión de las nanopartículas de plata en la pared y membrana celular**

El ion plata para interactuar con el citoplasma debe aumentar la permeabilidad de la membrana bacteriana, este proceso lo lleva a cabo por la formación de poros en la membrana. La acumulación de nanopartículas de plata en esta pueden causar desnaturalización de la membrana celular (29), asimismo puede provocar la liberación de lipopolisacáridos (30) y la pérdida de contenido celular como iones y proteínas (28). También, existe atracción electrostática entre la carga positiva de las AgNP y la carga negativa de la membrana celular, la cual resulta en la adherencia a la

pared celular, membrana citoplasmática (31). Además, existe interacción de las AgNP con las proteínas que contienen azufre, lo que provoca cambios irreversibles en la estructura (30).

El potencial antimicrobiano de las AgNP, por este mecanismo de acción, se ve afectado por la composición de la pared celular, donde las Gram negativo son más susceptibles que las Gram positivo, esto se explica por el espesor de la capa de peptidoglicán (32). En las bacterias Gram negativo, la carga negativa de los lipopolisacáridos en la membrana externa, promueve la adhesión de AgNP y hace que las bacterias sean más susceptibles (28).

#### **2.4.2. Penetración de las nanopartículas de plata dentro de la célula y desestabilización de estructuras intracelulares y biomoléculas**

Las nanopartículas de plata, pueden penetrar la pared celular, lo que puede causar el rompimiento de orgánulos, la lisis celular o afectar el funcionamiento vital, atacando moléculas como proteínas, lípidos y ADN (31):

- a) Proteínas: Al penetrar, la plata, a través de canales iónicos pudiendo no dañar la membrana, este desnaturaliza el ribosoma suprimiendo la expresión de proteínas esenciales para la supervivencia de la bacteria, por lo tanto, impidiendo la traducción de proteínas (11, 33). También, realiza la formación de un enlace estable S-Ag con los grupos tiol (SH) de las proteínas desactivadas (11, 28).
  
- b) Azúcar: Bloquea el metabolismo del azúcar al interactuar con la enzima fosfomanosa isomerasa e inactivarla, la cual es importante para la vía glucolítica (28).

- c) ADN: Los iones de plata pueden interactuar con el azufre y el fósforo del ADN, lo que puede causar problemas en la replicación de este (31). Además,  $\text{Ag}^+$  se puede intercalar entre los puentes de hidrógenos de los pares de bases de purina y pirimidina de las cadenas de ADN antiparalelas, lo que bloquea la transcripción de genes y eventualmente, la división y reproducción celular (34, 35).

Sumado a lo anterior, se ha observado la formación de compuestos insolubles con grupos sulfhidrilos de varias enzimas importantes para la generación de energía transmembrana y transporte de iones a través de la membrana celular. (11, 35)

#### **2.4.3. Toxicidad celular inducida por AgNP y estrés oxidativo**

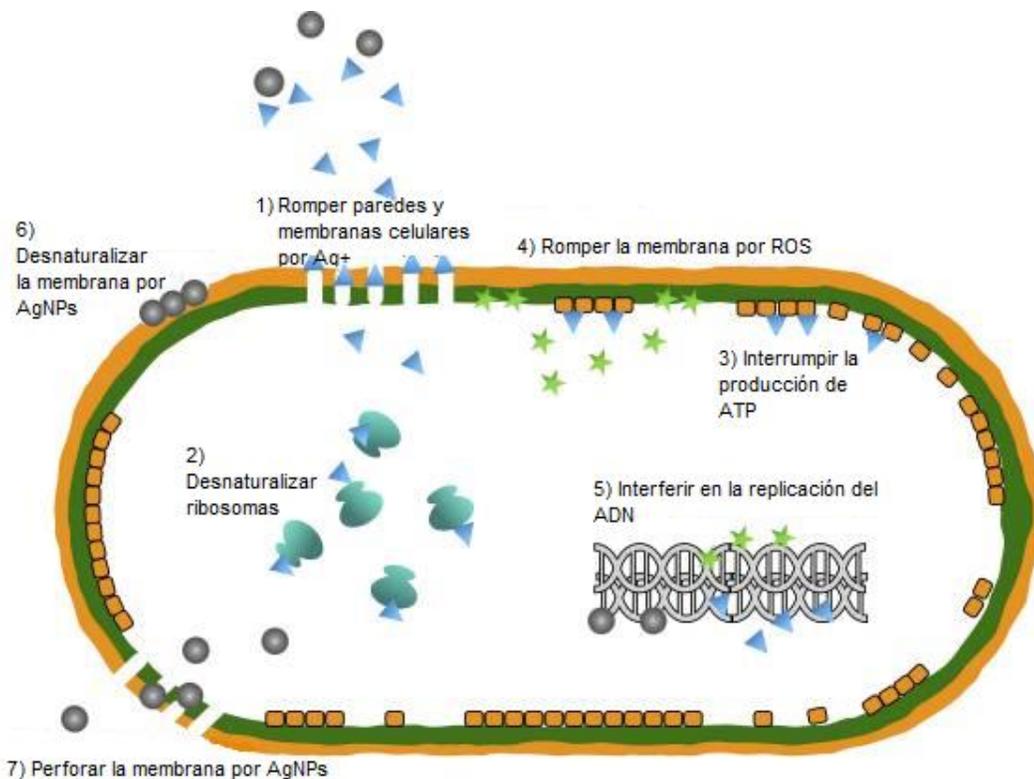
Las nanopartículas de plata tienen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno y el aumento del estrés oxidativo en las células (28). El efecto tóxico puede deberse a que los  $\text{Ag}^+$  liberados desde las AgNP interactúa con proteínas de la cadena respiratoria interrumpiendo la reducción intracelular de  $\text{O}_2$  (34). El exceso de radicales libres, causa daño directo a la membrana mitocondrial y finalmente, la muerte celular (28).

#### **2.4.4. Modulación de vías de transducción de señales**

Las nanopartículas de plata pueden participar en la transducción de señales bacterianas, la cual se ve afectada por la fosforilación de sustratos de proteínas (31). Las nanopartículas pueden desfosforilar residuos de tirosina en proteínas, lo que puede conducir a la inhibición del crecimiento microbiano y apoptosis (28).



**Figura 1. Las cuatro rutas más destacadas de acción antimicrobiana de las AgNP.** 1) Las AgNP se adhieren a la superficie celular microbiana y dan como resultado daños en la membrana y una actividad de transporte alterada. 2) Las AgNP penetran dentro de las células microbianas e interactúan con orgánulos celulares y biomoléculas, y por lo tanto, afectan la maquinaria celular respectiva. 3) Las AgNP causan un aumento de ROS dentro de las células microbianas que conducen al daño celular. 4) Las AgNP modulan el sistema de señal celular que finalmente causa la muerte celular. (Tomado y adaptado de Dakal, 2016) (28)



**Figura 2.** Las acciones antibacterianas de las nanopartículas de plata (AgNP). 1) Interrupción de la pared celular y la membrana citoplasmática: los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) liberados por las nanopartículas de plata se adhieren o atraviesan la pared celular y la membrana citoplasmática. 2) Desnaturalización de los ribosomas: los iones de plata desnaturalizan los ribosomas e inhiben la síntesis de proteínas. 3) Interrupción de la producción de adenosina trifosfato (ATP): la producción de ATP finaliza porque los iones de plata desactivan la enzima respiratoria en la membrana citoplasmática. 4) Interrupción de la membrana por especies reactivas de oxígeno: las especies reactivas de oxígeno producidas por la cadena rota de transporte de electrones pueden causar interrupción de la membrana. 5) Interferencia de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN): las especies de plata y oxígeno reactivo se unen al ácido desoxirribonucleico y evitan su replicación y multiplicación celular. 6) Desnaturalización de la membrana: Las nanopartículas de plata se acumulan en las fosas de la pared celular y causan desnaturalización de la membrana. 7) Perforación de la membrana: las nanopartículas de plata se mueven directamente a través de la membrana citoplasmática, que puede liberar orgánulos de la célula. (Tomado y adaptado de Yin, 2020) (31)

## 2.5. Resistencia a la plata

Las potenciales exposiciones repetidas de las bacterias a bajas concentraciones de plata y AgNP podría, al igual que con los antibióticos, ser contraproducente. Por lo que, se están explorando nuevas aplicaciones basadas en la combinación de AgNP con antibióticos, mayormente en bacterias resistentes a 3 o más clases de antibióticos aunque se han observado algunos efectos adversos con dicha combinación (10).

Los mecanismos de resistencia plasmídicas a los metales pesados han sido centro de estudio. A grandes rasgos, esta propiedad es resultado del “bombeo” dependiente de energía del ion tóxico por las proteínas de membrana, que son ATPasas o antiportadores catión/protón dependiente del potencial quiomiosmótico (12).

Uno de los plásmidos reportados es el pMG101, extraído de una sala de quemados desde *Salmonella spp.* Su peso, estimado por electroforesis en gel, es de 180 kb. Confiere a la bacteria resistencia a Hg<sup>+2</sup>, a telurito y varios antibióticos (36). La resistencia a plata que es conferida por este plásmido permite el crecimiento bacteriano en una concentración 0,6 mM de Ag<sup>+</sup> o superior en caldo Luria-Bertani estándar con NaCl agregado, lo que es más del 600% de la concentración tolerable para *Escherichia coli* sensible (12).

## 2.6. Jengibre

Jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), perteneciente a la familia Zingiberaceae. Se cultiva en todas las áreas tropicales del mundo y también se encuentra comúnmente en el sudeste asiático, especialmente en Indo-Malasia. Los componentes químicos activos en el jengibre son compuestos fenólicos: shogaoles y gingeroles, sesquiterpenos: bisapoleno, zingibereno, zingiberol, sesquiphellandreno, curcurmeno y otros compuestos como el 6-deshidrogeningerdiona, galanolactona, ácido gingesulfónico, zingerona, geraniol, glicolglucoalglucidales, neaguilagolidos, gralicoglicolidales, neaguilagolidos, neaguila, glicolglicidos (37).

El jengibre, posee muchos efectos farmacológicos diversos, incluyendo actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Varios estudios han encontrado que el jengibre también tiene una alta actividad antioxidante (38), la cual está dada por los compuestos fenólicos presentes que son principalmente gingeroles, shogaoles y paradols (39).

El extracto de jengibre se aisló del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe*. El jengibre contiene principalmente aceite esencial y oleorresina. La oleorresina es el componente picante no volátil. Sus componentes principales son los gingeroles, principalmente el 6-gingerol. Sin embargo, los gingeroles son inestables en presencia de luz, calor y aire (40).

## 2.7. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes de polímeros reticulados que tienen propiedades hidrofílicas como absorber y retener fluidos, al igual que, aumentar su tamaño miles de veces (41). La capacidad de absorber agua está dada por la presencia de grupos funcionales hidrofílicos como -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONH y -SO<sub>3</sub>H (42-44).

### 2.7.1. **Síntesis de hidrogeles**

Para la preparación de hidrogeles son necesarios los siguientes componentes: Agente disolvente, monómero, iniciador y agente reticulante o entrecruzador que genera uniones y permite que el hidrogel sea insoluble (45).

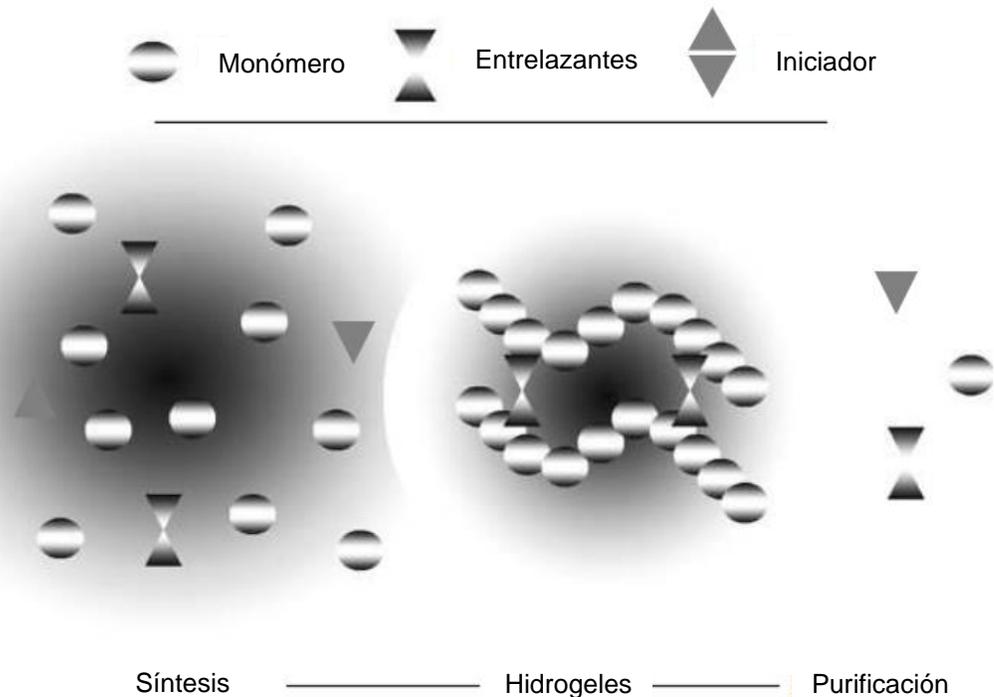
En la polimerización se tiene en solución una mezcla de monómeros y agente reticulante, pero esta no inicia hasta que esté el iniciador (43). Los sistemas iniciadores son variados y entre estos están: radicales libres, temperatura, iónicos, radiación gamma, redox (45).

En general, la síntesis de hidrogeles consta de tres partes que son monómero, iniciador y reticulante. Entre las técnicas para su generación encontramos la de dispersión inversa y en solución. Por un lado, la técnica por solución es homogénea, lo cual nos entrega un mejor control del calor de polimerización y, por lo tanto, de las propiedades del polímero. Mientras que, la técnica de dispersión inversa se realiza en las fases dispersa y continua, la mayoría de los hidrogeles de alto hinchamiento se

producen por esta vía. En su mayoría, el (los) monómero(s), el iniciador y el (los) reticulante (s) son libremente solubles en agua, o tienen buena solubilidad en agua (46).

El mecanismo de síntesis comienza con el iniciador de persulfato, el cual es un iniciador de radicales libres, se descompone bajo calentamiento para generar radicales aniónicos de sulfato. Los radicales extraen hidrógeno del grupo hidroxilo del alginato de sodio para formar macro radicales. Las moléculas de monómero de acrilato de sodio (AA) y acrilamida, que están cerca de los sitios de reacción, se convierten en aceptores de radicales de alginato, lo que resulta en el inicio de la cadena. A partir de entonces, se convierten en donantes de radicales libres a las moléculas vecinas para hacer crecer la cadena injertada. Luego, los grupos vinilo finales del MBA reaccionan sincrónicamente con las cadenas de polímero durante la propagación de la cadena para formar una estructura reticulada (7).

Después de la síntesis, la masa de hidrogeles necesita ser lavada para eliminar las impurezas que quedan del proceso de síntesis. Estas incluyen monómeros no reaccionados, iniciadores, reticuladores, así como productos no deseados producidos mediante reacciones secundarias (46). La **Figura 3** ilustra el proceso de síntesis y lavado (purificación) de los hidrogeles.



**Figura 3.** Síntesis de hidrogeles (Tomado y adaptado de Ottenbrite R., 2010) (46)

Luego de la síntesis de un hidrogel, este es sometido a secado, donde el agua se evapora causando el colapso de la estructura. El gel pasa de su estado expandido, de máximo hinchamiento, a un estado en donde es expulsado el disolvente, este proceso es reversible (47). En el estado seco, denominado xerogel, el gel es un material sólido, mientras que, cuando se encuentra en presencia de agua pasa a hidrogel, el cual es el resultado de un balance entre las fuerzas osmóticas, que es responsable de la penetración del agua entre las cadenas del polímero hidrófilo y las fuerzas cohesivas existentes entre las cadenas que oponen resistencia a la expansión. El hinchamiento alcanza su valor máximo, cuando se encuentran en balance ambas fuerzas (48).

Existen dos tipos de entrecruzamientos, el químico y el físico. En el químico, se ve involucrado la formación de enlaces covalentes entre las cadenas y puede obtenerse empleando monómeros multifuncionales a bajas concentraciones o por medio del acoplamiento de radicales generados por radiación. La cantidad de

entrecruzante debe ser baja, ya que esto aumenta la absorción de agua y viceversa, debido a que, una estructura rígida, altamente entrecruzada, no puede contener grandes cantidades de agua (48). Mientras que, el entrecruzamiento físico es obtenido por interacciones secundarias no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas o interacciones dipolo-dipolo (48). El grado de entrecruzamiento va a determinar sus propiedades de hinchamiento, y por consiguiente, su aplicación (49).

Para los sistemas con Acrilamida (Am) se usa como agente de reticulación soluble en agua el N, N'-metilenbisacrilamida (MBA) y el persulfato de potasio (KPS) como iniciador (50). El MBA es completamente soluble en el medio de reacción y posee la mayor reactividad, forma redes altamente ordenadas, las cuales limitan la entrada de agua (48).

El TEMED es utilizado como catalizador junto a un persulfato para la polimerización de la acrilamida en la síntesis de geles, ya que causan la formación de radicales libres del persulfato. La concentración de este va a depender de la concentración de la acrilamida. Una concentración baja puede dar como resultado que una parte del monómero no polimerice; por el contrario, un exceso de catalizador da paso a un número elevado de cadenas de acrilamida anormalmente cortas. La utilización de persulfato, es debido a su cinética de polimerización, la cual es rápida siendo iniciada en unos pocos minutos y su término varía entre treinta minutos a dos horas, este tiempo tiene como variable la temperatura y la concentración de acrilamida (51).

La acrilamida es un producto químico de amplio uso en la industria, una de ellas es la síntesis de poliacrilamidas. Se presenta como un polvo blanco cristalino soluble en agua, etanol, metanol, dimetiléter y acetona; pero no en heptano ni benceno. Se

polimeriza rápidamente al alcanzar el punto de fusión o estar expuesto a luz ultravioleta. Es estable a temperatura ambiente, pero puede polimerizarse bruscamente cuando se mezcla o expone a agentes oxidantes. Entre sus usos se encuentra el tratamiento de agua potable, acondicionador de suelos, en el procesado de la pulpa de papel, aditivo en cosméticos, para retirar sólidos en suspensión en aguas residuales, para procesado de minerales y como agente sellador (52).

### 2.7.2. Clasificación de los hidrogeles

- a. Según el origen del gelificante: Se pueden dividir en naturales, sintéticos e híbridos (mezcla de moléculas sintéticas y naturales) dependiendo del origen de las cadenas poliméricas (45, 53). Dentro de los polímeros naturales, se incluye el colágeno, la gelatina, almidón, agarosa y alginato (43). Mientras que, en los sintéticos, podemos encontrar poli (óxido de etileno), poli (alcohol vinílico) y poli (fumarato de propileno) (42) y son preparados por métodos de polimerización química (43).
  
- b. Según tipo de reticulación: Esta categoría está basada en la naturaleza de la unión de la red tridimensional y puede ser interacciones físicas o químicas (43).
  - i. **Reticulación física:** Hidrogel constituido por interacciones no covalente, como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas (53), fuerzas de Van Der Waals (45).
  
  - ii. **Reticulación química:** Presentan reticulaciones de tipo covalente entre las cadenas (54) y se pueden producir mediante reacciones de polimerización clásicas, como entre monómeros complementarios o reacciones mediante iniciador (53).

- c. Según apariencia física: Esta depende del proceso de preparación y puede ser como matriz o microesfera (43).
- d. Según la carga eléctrica de la cadena reticulada: se pueden clasificar en tres grupos principales, hidrogeles neutros, iónicos o anfóteros (55).
- i. **No iónico o neutro:** Aquellos hidrogeles que no presentan carga en su estructura. Estos se hinchan debido a las interacciones agua-polímero en el medio. Ejemplos de este son: poliacrilamida, polialcohol vinílico y polietilenglicol (55).
  - ii. **Iónico:** estos incluyen hidrogeles preparados a partir de monómeros con cargas iónicas, las cuales pueden ser positiva (cationes) o negativa (aniones) (56). El grado de hinchazón depende del pH del medio acuoso, debido a que este determina el grado de disociación de las cadenas iónicas (55).
    - Los hidrogeles catiónicos se disocian en medio ácido y presentan mayor hinchazón a un pH bajo (55). Estos pueden estar formados por homopolímeros básicos o catiónicos o copolímeros de monómeros catiónicos y neutros. También pueden formarse por reacciones de hidrólisis de las redes neutras preformadas o mediante adición de policationes en excesos (56). Ejemplos de estos monómeros son: metacrilato de aminoetil, metacrilato de dietilaminoetil y vinilpiridina (55).
    - Los hidrogeles aniónicos, en cambio, se disocian en medios básicos y muestran mayor hinchazón en pH alcalino (55). Formado por homopolímeros de monómeros ácidos o aniónicos o copolímeros de un monómero aniónico y otro neutro (56). Entre los hidrogeles aniónicos se encuentran el acrilato de sodio, ácido maleico, ácido itacónico, entre otros (55).

- iii. **Anfóliticos:** Este tipo de hidrogeles incluye cargas positivas y negativas que están en equilibrio en la misma cadena polimérica, pero un ligero cambio en el pH cambia estas propiedades (55). Algunas de las combinaciones que se incluyen dentro de esta categoría son: acrilato de sodio y 2-vinilpiridina, anhídrido maleico y N-vinilsuccinimida, y acrilato de sodio y 2- (dietilamino) etil 2-metil acrilato (56).
  
- e. Según su composición monomérica basada en el método de preparación: Se pueden clasificar en hidrogeles homopoliméricos, copoliméricos e hidrogeles poliméricos interpenetrantes (57).
  - i. **Hidrogeles homopoliméricos:** Contempla aquellas redes poliméricas que derivan de una sola especie de monómero (57), correspondiente a la unidad básica de cualquier red polimérica y dependiendo de la técnica de polimerización utilizada estos pueden tener estructura reticulada o no (43). Entre los hidrogeles reticulados se incluyen polimetacrilato de hidroxialquilo, polimetacrilato de glicerilo y polimetacrilato de 3-hidroxipropilo. Mientras que, entre los no reticulados de interés, están polietilenglicol (PEG), poliacrilamida (PAM) y polialcohol vinílico (PVA) (56).
  
  - ii. **Hidrogeles copoliméricos:** Compuestos por dos o más tipos de monómeros, al menos uno de estos presenta naturaleza hidrófila y dispuestos en forma aleatoria, en bloque o alterna a lo largo de la red de polímeros (42, 57). Entre estos se encuentra: y hidroxietil metacrilato-co-metil metacrilato (poli(HEMA-co-MMA)), polihidroxietil metacrilato-co-N-vinil-2-pirrolidona (Poli (NVP-co-

HEMA)), poli (ácido 2-hidroxietilmetacrilato-co-acrílico (poli (HEMA-co-AA)) (56).

- iii. **Hidrogeles poliméricos interpenetrantes (IPN):** Hechos de dos componentes poliméricos sintéticos o naturales reticulados independientes y entrelazados que no presentan uniones covalentes entre sí (43, 58). Un hidrogel de tipo semi-IPN es aquel que está constituido por un polímero reticulado y otro no reticulado (57).

### 2.7.3. Funciones de hidrogeles

Debido a sus propiedades, han sido variadas las aplicaciones de estos, entre los que encontramos aplicación en el área forestal, biosensores, sistemas de administración de fármacos, ingeniería de tejidos como el neuronal, lentes de contacto, vendajes para heridas, lentes intraoculares, sustitutos vítreos, hidrogeles vítreos de liberación de fármacos y posible aplicación en el tratamiento de aguas residuales (59-67). También han sido utilizados como sistema de administración de fármacos en variadas ramas de la medicina, como cardiología, oncología, inmunología, curación de heridas y manejo del dolor (68).

Pueden ser conductores de electricidad, mediante la incorporación de componentes conductores como nanomateriales de carbono, nanomateriales metálicos y polímeros conductores, los cuales pueden utilizarse para aplicaciones en los campos de sensores flexibles, supercondensadores, ingeniería de tejidos, entre otros (69).

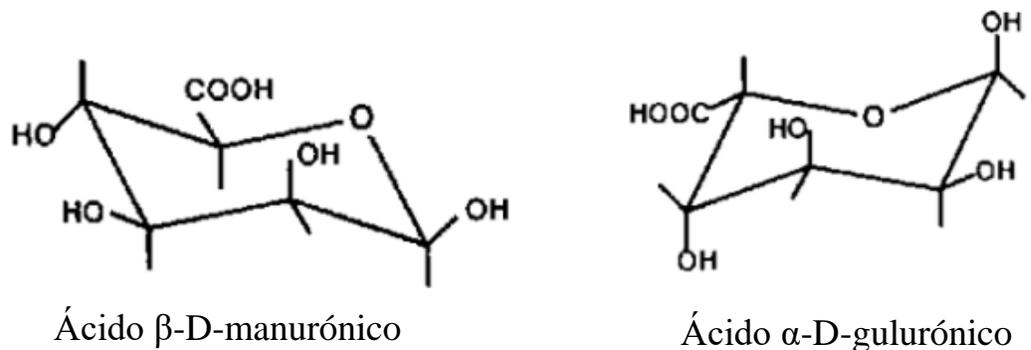
Los hidrogeles que contienen grupos hidrofílicos pueden usarse para producir nanopartículas, ya que presentan espacios libres entre las redes reticuladas en el estado

hinchado que puede comportarse como nano reactor (41). La presencia de reticulación química y física evita la solubilización de hidrogeles sin afectar los enlaces reticulados presentes entre el esqueleto polimérico cuando las moléculas de agua entran en la estructura de la red (70).

Los polímeros intercambiadores de quelantes, suelen ser copolímeros que contienen uno o más átomos donadores de electrones como N, S, O y P que pueden formar enlaces coordinados con la mayoría de los metales pesados tóxicos (71).

#### 2.7.4. Hidrogeles de alginato de sodio

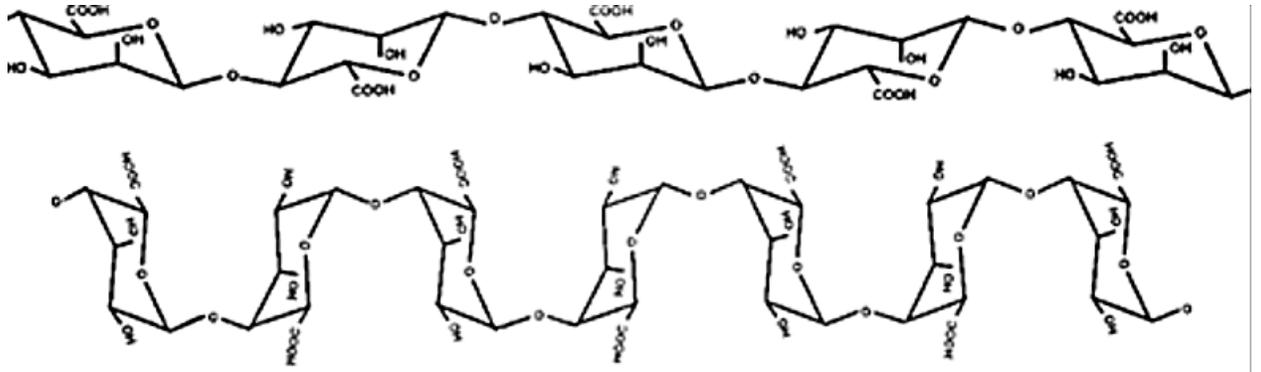
Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales, conteniendo cantidades variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico y de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, como se ilustra en la **figura 4**. El grado de polimerización de un alginato es una medida del peso molecular promedio de sus moléculas y corresponde al número de unidades de ácidos urónicos (ácido  $\beta$ -D-manurónico y de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico) en la cadena polimérica (72).



**Figura 4.** Monómeros del ácido algínico (Tomado y adaptado de Alvarado, E., 2009) (73).

El alginato de sodio (AS) es un polisacárido aniónico lineal natural, no tóxico, no inmunogénico, totalmente biodegradable, que en su estructura contiene grupos hidroxilo y carboxilo distribuidos a lo largo de una cadena principal de polímero. Por lo tanto, AS es compatible con colorantes e iones con carga positiva y puede usarse para tratar aguas residuales. Como material biodegradable natural, el uso de AS como adsorbente puede evitar la contaminación secundaria y otros problemas ambientales (74). En su mayoría, es extraído de algas pardas o bacterias del suelo, y ha sido utilizado en la industria alimentaria como espesante, así como en sistemas de administración de fármacos y en ingeniería de tejidos esto debido a sus propiedades no tóxicas, biodegradables, biocompatibles y su bajo precio. Sus grupos funcionales forman un enlace de reticulación con cationes polivalentes (excepto magnesio), creando un gel de alginato con grandes áreas específicas, por lo que se puede fabricar fácilmente microesferas con estructuras de red tridimensionales mediante reticulación con iones de calcio, que es más biocompatible que los agentes de reticulación tradicionales como el glutaraldehído y el formaldehído. Presenta una gran cantidad de grupos carboxílicos ionizables de AS (75-77).

En los hidrogeles de alginato, las características de flexibilidad o rigidez esta dado por la distribución de los monómeros en la cadena polimérica, además de la carga y el volumen de los grupos carboxílicos. Si en el hidrogel hay más ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, el gel es más duro y frágil, mientras que con mayor proporción de ácido  $\beta$ -D-manurónico, el gel es suave y elástico (78). Estos compuestos se van uniendo y formando cadenas poliméricas como se observa en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Bloques poliméricos de ácido manurónico (superior) y ácido gulurónico (inferior) (Tomado de Alvarado, E., 2009) (79).

Sobre la estabilidad de los alginatos, se observa una regla general, en la que los compuestos con un elevado grado de polimerización son menos estables que aquellos con un grado de polimerización bajo. El alginato de sodio es la sal sódica del ácido algínico, este último es el menos estable de los productos, pero se ha observado que materiales con alto grado de polimerización en los cuales las largas cadenas pueden degradarse en unidades menores en unos pocos meses a temperatura ambiente, mientras que los compuestos de cadenas más cortas resultan estables (72).

Independiente al grado de estabilidad, todo compuesto algínico comercial debe ser almacenado en un lugar fresco a temperaturas de 25°C o menores, pues a temperaturas superiores puede causar una importante despolimerización lo que afectaría las propiedades comercialmente útiles como la viscosidad y la fuerza de los geles (79).

a. Propiedades químicas

Entre los factores químicos, tenemos que la solubilidad del alginato en el agua disminuye con la presencia de otros compuestos, como azúcares, almidón o proteínas en el agua, que impiden su correcta hidratación. Por lo tanto, se recomienda agregar las sustancias extra después de que el alginato fue hidratado y disuelto (79).

Alginato es soluble en mezclas de agua, las soluciones acuosas (1%) de alginato toleraran un 10 – 20% de adición de disolventes miscibles como alcohol y cetonas. La adición de cationes polivalentes en pequeñas cantidades inhibe la hidratación de los alginatos y, altas cantidades causan su precipitación (72).

La solubilidad del alginato, a su vez, está influenciada por factores físicos y químicos. Dentro de los factores físicos se encuentran tamaño y forma. A mayor tamaño, las partículas son más fáciles de dispersar y suspender, pero tienen una baja velocidad de hidratación. Mientras que partículas más finas, se disolverán más rápido, pero tienen mayor riesgo de aglomeración. Además, al aumentar la concentración de alginato, la solución pasa de líquido viscoso a pasta espesa (72).

b. Propiedades físicas

- i. **Rigidez:** La rigidez de los geles de alginatos está directamente relacionada con el contenido del bloque GG (ácido  $\alpha$ -L- gulurónico). En su forma de sal monovalente, los alginatos son solubles en agua y aumentan la viscosidad del solvente en disolución, es decir, es espesante (72).

**ii. Viscosidad:** Esta propiedad le genera características únicas como espesante, estabilizante, gelificante, etc. Estas soluciones exhiben una alta viscosidad que depende principalmente de la concentración, estructura molecular y grado de polimerización del alginato. La viscosidad puede ser muy variable y es función de numerosos factores, entre los que se mencionan:

- Peso Molecular: cuanto mayor es peso molecular del alginato, más viscosas resultan sus soluciones (79). El peso molecular de los compuestos de alginato se puede controlar variando las condiciones de extracción y manufactura (72).
- Concentración: El alginato de sodio más empleado presenta una viscosidad de 0,2 a 0,4 Pa·s en soluciones al 1% en agua (79), comparado con una viscosidad de 0,001Pa·s para el agua destilada. La viscosidad se eleva muy rápidamente al aumentar la concentración por encima del 2% p/p
- Temperatura: dentro de cierto rango, la viscosidad de las soluciones de alginato disminuye aproximadamente 2,5% por cada grado de incremento en la temperatura. El proceso es reversible, pudiendo la solución volver a su viscosidad inicial por enfriamiento, sin embargo, si las soluciones se mantienen a temperaturas elevadas (mayores a 50°C) durante períodos extensos, la viscosidad decrece irreversiblemente debido a un proceso de despolimerización (72).
- pH: la viscosidad de las soluciones de alginato de sodio casi no se ve afectada en el rango entre pH 5 y 10, siendo ligeramente mayor cerca de la neutralidad debido a efectos repulsivos de los grupos carboxilos cargados negativamente (COO<sup>-</sup>), los que mantienen extendidas las cadenas del polímero e incrementan su capacidad de unión de moléculas de agua. A niveles inferiores a pH 4,5 la viscosidad aumenta debido a que los grupos COO<sup>-</sup> libres comienzan a convertirse en COOH, lo que reduce la repulsión electrostática entre las cadenas y pueden acercarse y formar puentes de hidrógeno.

Si el pH se reduce aún más, se formará un gel, generalmente un pH 3,5 o inferior. Si el pH aumenta por encima de pH 11, se produce despolimerización lenta, provocando una disminución de la viscosidad (80)

- Fuerza Iónica: La viscosidad decrece levemente por la adición de sales de cationes monovalentes. El polímero en solución, al ser un poli-electrolito, tiende a contraerse al aumentar la fuerza iónica de la misma. Este efecto se hace máximo a concentraciones salinas cercanas a 0,1 N (79).

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

Hidrogeles de Alginato de sodio conteniendo AgNP obtenidas del extracto de jengibre conservan las propiedades antimicrobianas propias de las AgNP solas.

#### 3.2. Objetivo

**3.2.1 Objetivo general:** Sintetizar hidrogeles con nanocompuestos de plata, utilizando extracto de jengibre (*Zingiber officinale*) como agente reductor natural y evaluar su actividad antimicrobiana.

**3.2.2 Objetivos específicos:**

1. Sintetizar de hidrogel de alginato de sodio utilizando acrilamida, acrilato de sodio y persulfato de potasio como iniciador.
2. Introducir iones de plata en los hidrogeles por absorción, los cuales se reducen con extracto de jengibre.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles con AgNPs sintetizadas.
4. Caracterizar a través de espectroscopía UV-vis y FTIR nanocompuestos de plata en hidrogeles de alginato.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Preparación del extracto

Se peló 20 gramos de jengibre (*Zingiber officinale*), para posteriormente, lavarlos con abundante agua destilada. Luego se cortó en trozos de 0,5 cm x 0,5 cm aprox. y se introdujo en un matraz de fondo redondo de 250 mL con 100 mL de agua y 100 mL de alcohol etílico. La solución se calentó a 90°C durante 3 horas para extraer el contenido del jengibre y se filtró a través de la técnica de la filtración al vacío (Embudo Büchner y matraz Kitasato).

### 4.2. Síntesis de hidrogel de alginato de sodio

En un vaso precipitado fueron pesados 0,5 g de alginato de sodio y se les agregó 25 ml de agua destilada. Posteriormente, los hidrogeles fueron sintetizados en una placa de Petri al añadir alginato de sodio (AS) en distintas cantidades, acrilamida (Am), AA, MBA, KPS y tetrametiletilendiamina (TEMED) como se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Esquema de síntesis de hidrogeles con alginato de sodio.

Formulación de código	AS 2% (mL)	Am (g)	AA (g)	MBA (μL)	KPS (μL)	TEMED (μL)
H-C0	0	1	0,1	1000	1000	1000
H-C1	3	1	0,1	1000	1000	1000
H-C2	6	1	0,1	1000	1000	1000
H-C3	9	1	0,1	1000	1000	1000
HAgNP-0	0	1	0,1	1000	1000	1000
HAgNP-1	3	1	0,1	1000	1000	1000
HAgNP-2	6	1	0,1	1000	1000	1000
HAgNP-3	9	1	0,1	1000	1000	1000

AS: Alginato de sodio. Am: Acrilamida. AA: Acrilato de sodio. MBA: N, N'-metilenbisacrilamida. KPS: Persulfato de potasio. TEMED: N, N, N', N'-tetrametilendiamina

Tras agregar el AS se añadió 5 ml de agua destilada y agitó 10 minutos en el agitador magnético, después se añadió el Am y AA, y se agitó 30 minutos más. Luego se agregó MBA y agitó 10 minutos. Por último, se incorporó al mismo tiempo el KPS y TEMED. Se esperó hasta su solidificación. Luego de estar en estado sólido, se dejó en la estufa (60°C) y tras su completo secado, se raspó con la espátula y guardó en envases herméticos.

#### 4.3. Síntesis de nanopartículas de plata

Se tomó la lámina seca de hidrogel y agregó a un plato de cristalización con 700 ml de agua destilada y se dejó por 1 día, cada 4 horas se lavó con agua destilada. Luego se procedió a fragmentar el hidrogel en trozos de 1 cm x 1cm aproximadamente. Lo obtenido se dividió en 2 partes, una de ellas para ser tratada con la solución de nitrato de plata y la otra sin ella.

Para la preparación de la solución de plata, en un vaso precipitado agregó 17 g de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en 200 ml de agua destilada, y se dejó en el ultrasonido 10 a 15 minutos.

La porción de cada hidrogel seleccionada para ser tratada con la solución de nitrato de plata se colocó en un vaso precipitado junto con 50 ml de esta, los cuales se dejaron en oscuridad por 24 hrs, formando así los hidrogeles: HAgNP-0, HAgNP-1, HAgNP-2,

HAgNP-3. Aparte, se dejó a secar las porciones sin plata, dando lugar a H-C0, H-C1, HC-2, H-C3.

Para la reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  los hidrogeles cargados con iones de plata se lavaron con agua destilada para eliminar los iones en la superficie y la solución de plata fue reemplazada por extracto de jengibre que se dejó durante la noche en oscuridad para evitar la fotosensibilidad sobre la síntesis de las nanopartículas de plata (AgNP) a temperatura ambiente. Luego se extrajo el jengibre y se dejó secar en la estufa ( $60^\circ\text{C}$ ) y tras su completo secado, se raspó con la espátula y se guardaron en envases herméticos, se hizo también con los hidrogeles sin plata.

#### 4.4. Caracterización de las nanopartículas

##### **4.4.1. Espectro UV-visible de síntesis de nanopartículas de plata**

Se masó aproximadamente 25 mg de cada muestra y se depositó en un frasco ámbar con 10 mL de agua destilada. Para el análisis se utilizó un espectrofotómetro UV (Rayleigh UV-2601), en un parámetro de 200 a 800nm. Para ello, se utilizaron celdas de 3 mL y se corrió en primera instancia el blanco que correspondía al sobrenadante del hidrogel sin plata (H-C3) y posteriormente, el sobrenadante de cada una de las muestras (HAgNP-1, HAgNP-2 y HAgNP-3).

#### **4.4.2. Espectroscopía infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR)**

La presencia de grupos funcionales en la estructura de los hidrogeles fabricados se determinó por técnica de FTIR analizando los *peaks* característicos dados por FTIR con la finalidad de confirmar que los hidrogeles fabricados tenían los componentes requeridos. Se tomó aproximadamente 0,25 mg de cada hidrogel (H-C3, HAgNP-0, HAgNP-1, HAgNP-2, HAgNP-3) y se secó en la estufa a 60°C. Se utilizó el equipo de espectrofotometría infrarroja Nexus 470 FT-IR en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  y para ellos se formó una pastilla en un mortero en proporción 1:3 entre la muestra y bromuro de potasio (KBr) respectivamente.

#### **4.5. Actividad antimicrobiana**

Solo hidrogeles que fueron seleccionados para los estudios de actividad antimicrobiana fueron HAgNP-1 y HAgNP-2.

##### **4.5.1 Screening de susceptibilidad antibacteriana**

Los estudios antibacterianos del hidrogel copolimérico placebo y su hidrogel nanocompuesto de plata se llevaron a cabo utilizando un método de disco de papel en medio Agar Soya (extracto de carne de res (3 g), peptona (5 g), NaCl (5 g) y agar-agar (15 g) a un pH ajustado a 7.061 (medidor de pH ELICO)). El medio agar soya se preparó usando medios comerciales. Y luego se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 min. El medio se vertió en placas de Petri estériles de 20 ml de volumen y se dejó solidificar.

Se realizaron caldos de 0,5 McFarland con *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Serratia spp* y *Salmonella typhimurium*, los cuales se sembraron con tórula estéril en forma de césped, al igual que la técnica de antibiograma.

Cada placa sembrada fue dividida en 4 para luego colocar un disco de papel filtro, el cual fue sumergido en una solución de hidrogel, proceso que debe ser menor a 7 segundos. Estos discos se dispusieron en el centro de la sección correspondiente de la placa. Las soluciones de hidrogel contenían 20 mg de hidrogel (HAgNP-1 o HAgNP-2) suspendido en 10 mL de agua destilada. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se observó la existencia de una zona de inhibición alrededor del disco.

El criterio de evaluación utilizado fue: positivo, si se evidencia un halo inhibitorio alrededor del disco, y negativo, con la ausencia de este. Acotar que no se tomó en cuenta el diámetro del halo, solo la presencia de este.

#### **4.5.2 Estudio cuantitativo de actividad antibacteriana**

Las bacterias usadas en este estudio fueron Gram positivo (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y Gram negativo (*Acinetobacter baumannii*, y *Salmonella typhimurium*).

Se preparó Caldo Soya utilizando medios comerciales. En tubos estériles se agregó 20 mg de HAgNP-1 y HAgNP-2, los cuales se dejaron destapados en UV durante 30 minutos.

Se preparó 8 ml de estándar 0,5 McFarland (0,1 UA) de cada bacteria y colocaron en la estufa a 37°C por 30 minutos. Se siguió el siguiente esquema señalado en la **tabla 3**.

**Tabla 3.** Esquema de trabajo para prueba de actividad antimicrobiana

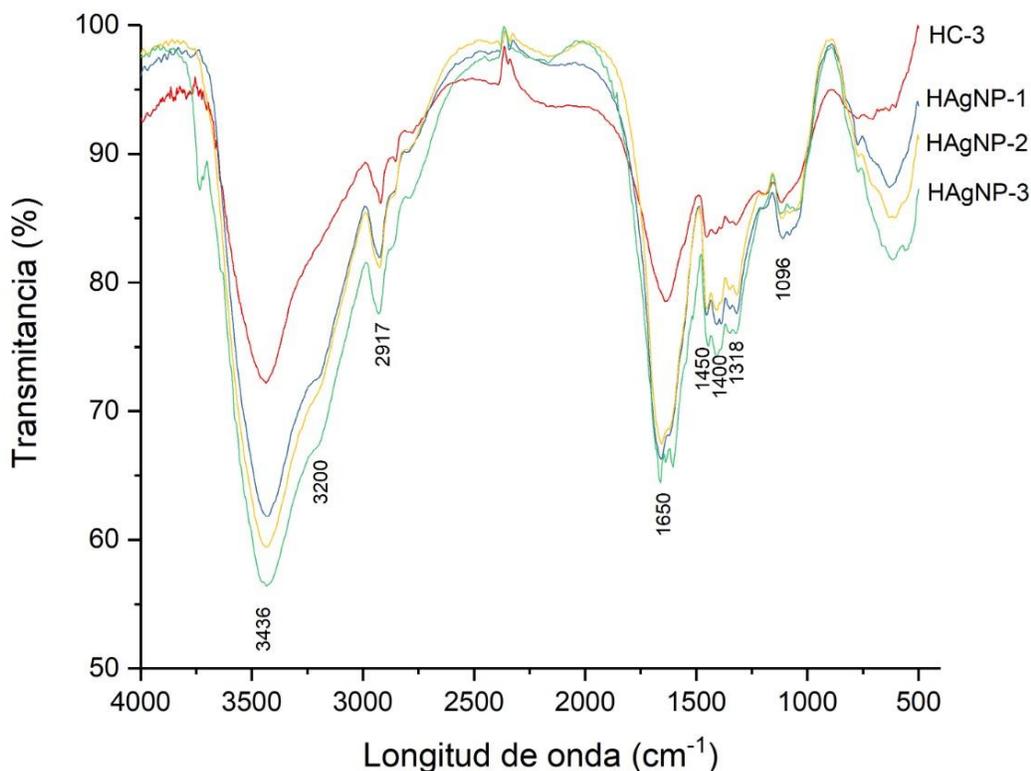
	<b>Caldo Soya (ml)</b>	<b>Estándar (ml)</b>	<b>HAgNP-1 (mg)</b>	<b>HAgNP-2 (mg)</b>
<b>Tubo 1</b>	1	0	0	0
<b>Tubo 2</b>	1	0	0	0
<b>Tubo 3</b>	1	0	20	0
<b>Tubo 4</b>	1	0	0	20
<b>Tubo 5</b>	0	1	0	0
<b>Tubo 6</b>	0	1	20	0
<b>Tubo 7</b>	0	1	0	20

Los tubos 5, 6 y 7 se realizaron con cada bacteria, mientras que los tubos 1, 2, 3 y 4 solo se prepararon 1 vez

Se colocó los tubos en baño termostático con agitación constante por 37°C durante 24 horas. Se extrajeron alícuotas de un volumen de 10 µl los cuales se agregaron a un tubo eppendorf con 90 µl de agua peptonada al 1%. De cada dilución, se sembró 10 µL en placa de agar soya utilizando el método de siembra en césped y se incubaron a 37°C durante 24 horas, para finalmente realizar el recuento de UFC.

## 5. RESULTADOS

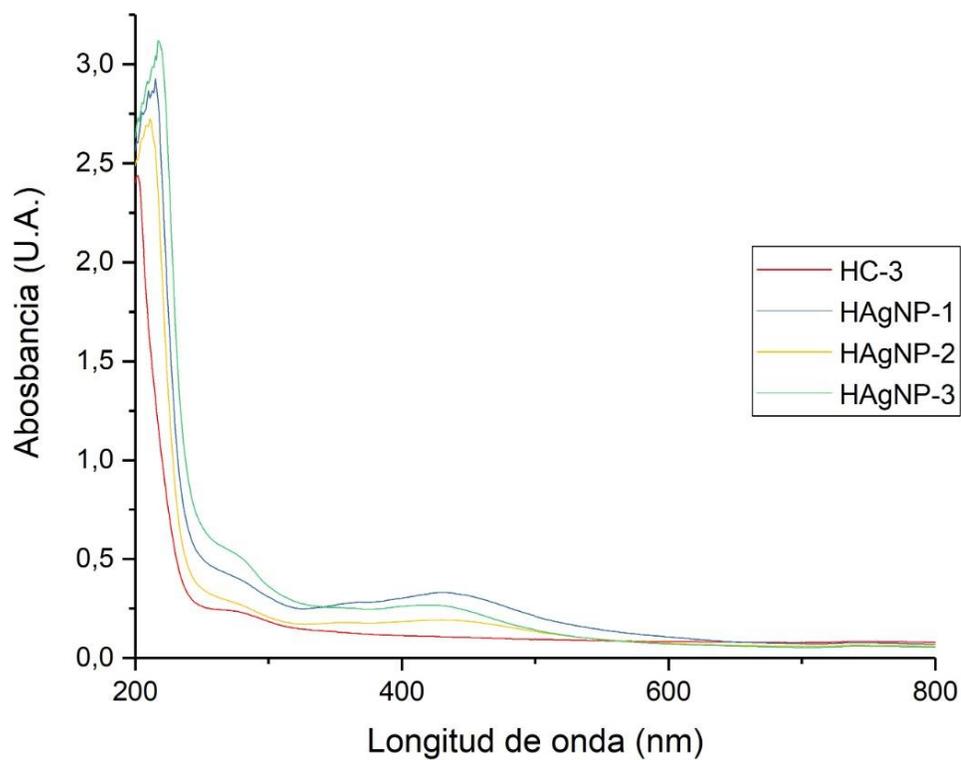
### 5.1 Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)



**Figura 6.** Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de los hidrogeles: H-C3 (Hidrogel sin plata), HAgnP-1, HAgnP-2 y HAgnP-3 hidrogeles con nanopartículas de plata con diferentes volúmenes de AS.

La **figura 6** muestra los espectros de FTIR de los hidrogeles, en donde (H-C3) representa al hidrogel de alginato de sodio y (HAgnP-1), (HAgnP-2) y (HAgnP-3) representan a los hidrogeles con nanopartículas de plata con distintos volúmenes de AS. Se observa que en el espectro de absorción, los peak en 3436 y 1650 cm<sup>-1</sup> son notoriamente más fuerte en los hidrogeles con nanopartículas de plata (HAgnP-1, HAgnP-2 y HAgnP-3) en comparación con el control (H-C3).

## 5.2 Espectro UV-Visible de los diferentes compuestos



**Figura 7.** Espectro UV-Visible de los diferentes compuestos.

En la **figura 7** se muestra la aparición de bandas de absorción entre los 400 y 450 nm, en los hidrogeles con AgNP (HAgNP-1, HAgNP-2 y HAgNP-3), no así en HC-3, que corresponde al hidrogel sin AgNP.

### 5.3 Screening de actividad antimicrobiana

Se apreció actividad antimicrobiana, en forma de halo de inhibición, de los geles frente a las bacterias de la especie *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia spp*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

De las bacterias en las que se presencié actividad antimicrobiana, se seleccionó *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii* y *Bacillus cereus* para continuar el estudio.

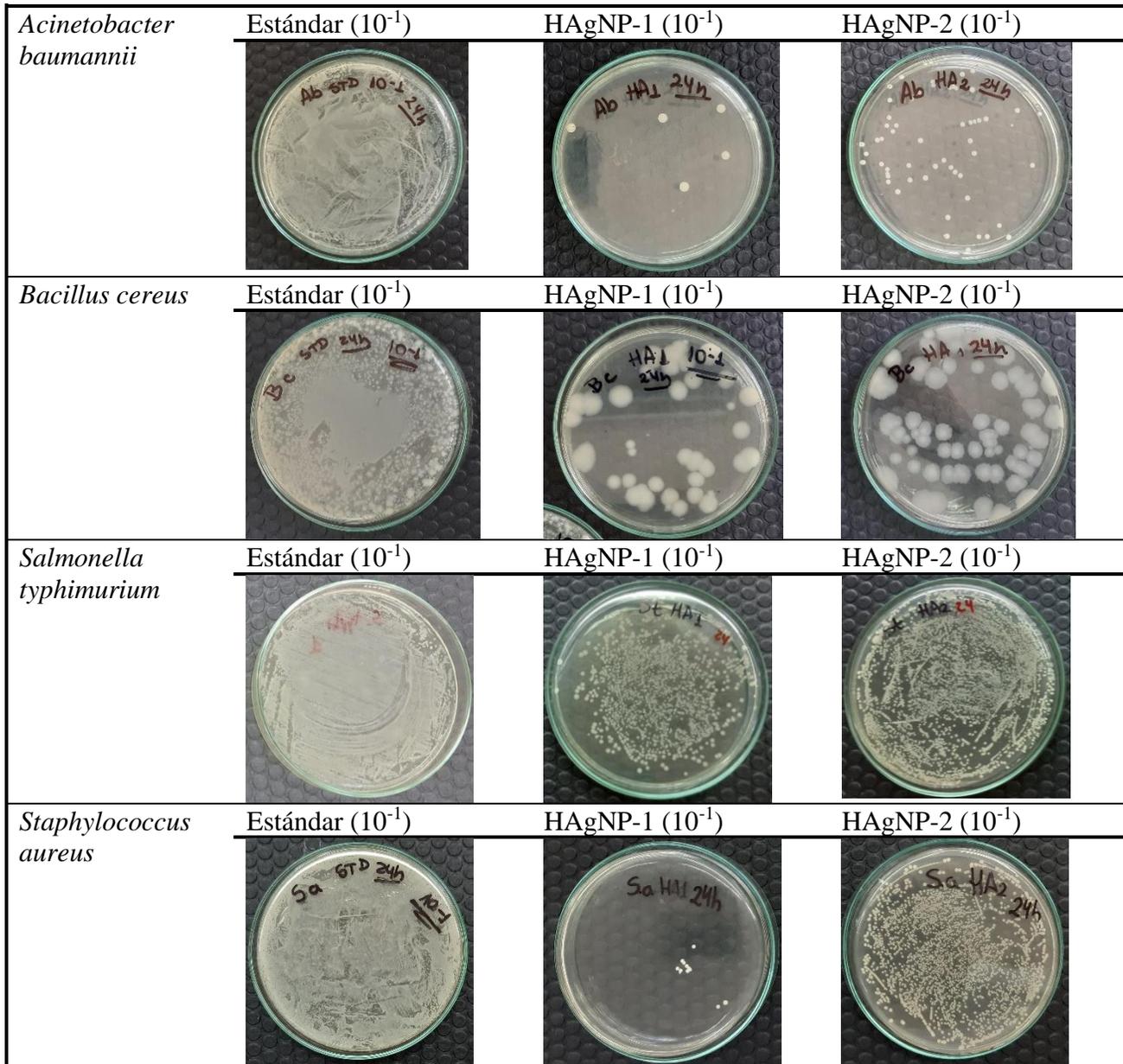
### 5.4 Recuento bacteriano con el método de punto final.

El cálculo del recuento bacteriano se realizó como se describe en el *Anexo I*.

**Tabla 4.** Recuento de colonias en Placa Agar Soya a las 24 horas de ser sembradas, incubadas a 37°C y porcentaje de inhibición comparado con el estándar 0,5 McFarland.

Cepas bacterianas	Recuento (UFC/mL) a las 24 horas.			% de inhibición	
	Estándar	HAgNP-1	HAgNP-2	HAgNP1	HAgNP-2
<i>A. baumannii</i>	426.000.000	6000	60000	99,9%	99,9%
<i>B. cereus</i>	173.000.000	2000	19000	99,9%	99,9%
<i>S. aureus</i>	394.000.000	12000	200000	99,9%	99,9%
<i>S. typhimurium</i>	185.000.000	103000	1092000	99,9%	99,4%

**Tabla 5.** Actividad antibacteriana de los hidrogeles con nanopartículas de plata frente a las bacterias: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, todos con dilución  $10^{-1}$ .



## 6. DISCUSIÓN

A pesar de no medir el tamaño exacto de las nanopartículas formadas, podemos corroborar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles con nanopartículas de plata. Esta propiedad, fue demostrada en bacterias Gram positivo y negativo como se observa en la **tabla 5**, en donde se aprecia una disminución importante de las colonias en comparación con la bacteria sin presencia de hidrogel como se ilustra en la **Tabla 4** una disminución en el recuento de colonias después de 24 horas de exposición a las AgNP.

Comparando los resultados de estudios anteriores con los obtenidos, es posible confirmar que el uso del extracto de jengibre permite llevar a cabo la reducción de los iones metálicos ( $\text{Ag}^+$ ) a nanopartículas ( $\text{Ag}^0$ ) con un proceso de síntesis verde utilizando extracto de jengibre a temperatura y presión ambiente (81). Al añadir el extracto de jengibre, la solución incolora de  $\text{AgNO}_3$ , se tornó a un color amarillo – dorado, lo que es indicativo de la formación de las nanopartículas de plata, como se observa en **Anexo 4: Figura 8**. HAgNP-1 y **Figura 9**. HAgNP-2 El cambio de color se debió a la excitación de la superficie del plasmón, que tiene valores de longitud de onda que se informaron en el rango visible de 400 – 450 nm (82, 83). Además, se utilizó espectroscopía UV-Vis para examinar más a fondo la formación de AgNP, como se vio en la **Figura 6**, el espectro de absorción mostró un peak a los 400 nm, el cual es característico de las nanopartículas de plata. Esto indica que el extracto de jengibre podría funcionar como reductor químico para sintetizar AgNP (83).

En cuanto al estudio de FTIR que se mostró en la **Figura 6**, el control HC-3, mostró su máximo nivel de absorción a los  $3436 \text{ cm}^{-1}$ , el cual se debió al estiramiento del grupo funcional O-H, los *peaks* observados a los  $2917 \text{ cm}^{-1}$  se explica por las vibraciones causadas por el estiramiento del grupo CH (81, 84, 85).

El pico a los  $1096\text{ cm}^{-1}$  se puede asignar a las vibraciones C-O de la columna vertebral de alginato, mientras que, a los  $1650\text{ cm}^{-1}$  se debe al estiramiento C-O del grupo -COOH de la unidad de ácido algínico. El grupo de *peaks* que apareció a los  $1450$ ,  $1400$  y  $1318\text{ cm}^{-1}$ , indican la deformación de O-H de los grupos C-OH terciarios (84, 86).

El espectro observado en las AgNP, comparten los *peaks* de absorción con el alginato, donde los *peaks* a  $3436\text{ cm}^{-1}$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  fueron notoriamente más fuertes, lo que indicaría que estos grupos (carboxilo e hidroxilo) son los responsables de la síntesis y estabilización de las AgNP. Estos datos son similares a otros estudios sobre la biosíntesis de AgNP (81, 86).

Inicialmente, el persulfato de potasio, que se usó como un generador de radicales libres, se descompone bajo calentamiento para generar radicales aniónicos de sulfato, a su vez, TEMED, acelera la velocidad de formación de estos radicales libres (87, 88). Los radicales extraen hidrógeno del grupo hidroxilo del alginato de sodio para formar macro radicales. Los receptores de estos radicales libres, serán los monómeros de acrilato de sodio y acrilamida, lo que resulta en el inicio de la cadena. Desde ese entonces, estos serán los donantes de radicales libres a las moléculas vecinas para hacer crecer la cadena. Luego, los grupos vinilo finales del MBA (reticulador) reaccionan sincrónicamente con las cadenas de polímero durante la propagación de la cadena para formar una estructura reticulada. (88).

El tipo de hidrogel sintetizado fue de tipo red semi-interpenetrante (semi-IPN), formado por el copolímero de acrilamida y acrilato de sodio reticulados y el polímero lineal atrapado en su interior, el cual correspondía a alginato. Este se sintetizó mediante copolimerización en plantilla en presencia de alginato de sodio como una matriz y N,N, metilen-bisacrilamida como agente de reticulación. Esta red contenía enlaces covalentes que

retuvieron la estructura tridimensional de hidrogel y enlaces iónicos que otorgaron una resistencia mecánica mayor (81, 87, 88).

La estructura química que forma el hidrogel juega un papel crucial en la retención e interacción de iones metálicos e incluso no metálicos. Además, la elección de los materiales para la síntesis del hidrogel es importante. En este caso, la generación de cadenas laterales hidrofílicas juega un papel importante en la estabilización al incrustar AgNP unidas en la proximidad de un esqueleto de polímero y aisladas de las especies circulantes. Los geles de tipo semi-IPN, como el utilizado en este estudio, tienen varias cadenas hidrofílicas, como -OH, -COONa, -CONH<sub>2</sub>, -COO- y -NH<sub>2</sub>, que pueden contener grandes cantidades de iones metálicos como Ag<sup>+</sup> debido a su capacidad de anclaje. Además, otorgan capacidades de reducción, así como, mejorar la estabilización de las nanopartículas formados gracias a los enlaces de hidrógeno formados en las cadenas del hidrogel que contienen grupos hidrófilos (89).

Las nanopartículas fueron sintetizadas con el método de síntesis “*in situ*” en el cual, comúnmente, no se emplean agentes estabilizadores, ya que mayormente el medio o sustrato en el cual se realiza la síntesis permite la dispersión y distribución homogénea de las nanopartículas al irse formando dentro de él, es debido a esto que la incorporación y síntesis de las nanopartículas se realizó colocando los geles hinchados en la solución de AgNO<sub>3</sub> para que los iones Ag<sup>+</sup> penetren hacia el interior de la red hinchada, para luego ser transferidos a la solución de jengibre donde estos son reducidos y formar las nanopartículas (90).

Se utilizó diferentes volúmenes de alginato de sodio para realizar la síntesis de hidrogeles. Los resultados demostrados en la **tabla 4** muestran que los hidrogeles con menor cantidad de alginato de sodio (HAgNP-1), tienen menor recuento bacteriano en comparación a HAgNP-2, que tiene mayor cantidad de alginato de sodio.

Según estudios realizados por Manjula (2013) y Agnihotri (2019), muestran que la cantidad de alginato de sodio influye significativamente en la liberación de los medicamentos desde el hidrogel, donde el aumento del contenido de alginato de sodio, es directamente proporcional al hinchamiento y la liberación del fármaco (88, 91).

En relación a *swelling ratio*, como se muestra en el **Anexo 2: Tabla 6**, mejora al contener nanopartículas de plata, los cuales provocaron el agrandamiento de las redes poliméricas (88, 91, 92). Sin embargo, un aumento elevado en relación a la cantidad de alginato de sodio (como es el de HAgNP-3), disminuye las propiedades de hinchamiento, lo que puede deberse al llenado de los espacios de la red polimérica por partículas de plata y a la quelación de algunos grupos hidroxilo y carboxilato del hidrogel (90).

La liberación de plata desde el interior de los hidrogeles generó resultados variables según el tiempo de contacto de la bacteria con el hidrogel (ver **Tabla 5**). La cinética de liberación, incluida la velocidad de difusión, dependen del área superficial, la geometría y la densidad de la membrana, así como el nivel de reticulación del hidrogel (89). El estudio de liberación de plata no se realizó, ya que se encontraba fuera de las directrices del problema planteado para la investigación. Sin embargo, un estudio realizado por Bulut E, Sanli O. (2016), informa que la liberación de un fármaco desde los hidrogeles aumenta con un aumento de la relación PVP / Alginato de sodio (77), lo cual podría ser otra variable para explicar por qué los hidrogeles con menor relación alginato/acrilamida-acrilato (HAgNP-1), presentan una mayor actividad antimicrobiana que los con una menor razón (HAgNP-2). Por lo que, el estudio de esta propiedad resulta ser importante para conocer el tiempo en el cual el hidrogel cumple con su máxima actividad antimicrobiana.

Se señala que las bacterias Gram positivo, son más susceptibles a las AgNP que las Gram negativo, esto debido a la organización de su pared celular. Las bacterias Gram positivo

cuentan con una cantidad considerablemente mayor de peptidoglicano que la pared de las Gram negativo (93). Pero a pesar de que el potencial antibacteriano de las nanopartículas de plata está influenciado por la composición y grosor de la pared celular de los microorganismos, en esta investigación se encontró que en ambos tipos bacterianos (Gram positivo y Gram negativo) ocurrió inhibición del crecimiento y multiplicación bacteriana, cuantificándose en sobre el 99% de inhibición en todos los casos, como se ve en la **Tabla 4**. Para corroborar la actividad antimicrobiana de las AgNP, se realizaron controles como lo ilustra en *Anexo 3:Tabla 7*.

Esto se pudo deber a la liberación de iones  $Ag^+$  desde las nanopartículas, los cuales pueden atravesar la pared celular, ingresar a la célula y utilizar diferentes mecanismos antibacterianos (ver **Figura 1** y **Figura 2**). Entre estos están: inhibición de la capacidad de replicación del ADN al convertirlo en una forma condensada, interacción de los iones de plata con los grupos tiol de las proteínas e inactivación de la actividad enzimática y al ser un metal pesado, puede causar depósitos de proteínas (28). Todo lo anterior, es favorecido por la carga total de las células bacterianas, la cual es negativa a valores de pH biológico (en este caso, simulado por el pH del Agar soya utilizado) por el exceso en el número de grupos carboxílicos, por lo que la carga positiva de los iones plata generan atracción electrostática (94).

Sin embargo, parámetros importantes como el tiempo de liberación de la plata, el tamaño de las AgNP, su toxicidad *in vivo* y el mecanismo de acción exacto realizado por las nanopartículas de plata sintetizadas no se encuentran dentro de las aristas de esta investigación.

## 7. CONCLUSIONES

1. Las nanopartículas son una opción útil frente al desarrollo de nuevos materiales antimicrobianos, contra bacteria de tipo Gram positivo y Gram negativo, sin embargo, podría evaluarse su actividad antimicrobiana frente a biopelículas o a otro tipo de microorganismos, como virus u hongos.
2. Hemos demostrado un enfoque ecológico y rápido de química verde para la síntesis de AgNP mediante el uso de *Zingiber officinale*, que proporciona una forma simple, rentable y eficiente para la síntesis de AgNP, lo cual se corroboró con la espectroscopía UV-Vis.
3. Es relevante destacar la importancia de la estandarización y reproducibilidad en este tipo de ensayos, en el cual se debe realizar una combinación de distintas metodologías para poder confirmar la propiedad antimicrobiana, como se aprecia en este trabajo.
4. Extrapolar el uso de las AgNP, tanto en humanos como, en otros seres vivos requiere estudios nuevos y más complejos que permitan evaluar la razón riesgo/beneficio de su uso, estudiando así su toxicidad *in vivo*.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1: Determinación cuantitativa del crecimiento bacteriano (UFC/mL)

Se tomó una alícuota de  $\mu\text{L}$  de cada tubo, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada 1:10 hasta  $10^{-1}$  para las muestras que contenían hidrogel y  $10^{-5}$  para las que no. Posteriormente se sembró en placas de Agar soya tripticasa y se contó las colonias después de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

A partir del conteo de colonias y la dilución utilizada, se calculó las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Para la determinación del porcentaje de inhibición de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%I = ((B-A)/B) \times 100$$

**Donde:**

% I= Porcentaje de Inhibición.

A= UFC viables en muestra tratadas con nanopartículas de plata

B= UFC viables en muestra control

## 8.2. Anexo 2: Swelling ratio

Se secó un trozo de cada hidrogel y se masaron en la balanza analítica, posteriormente se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente y se masaron nuevamente. La capacidad de hinchamiento del hidrogel se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Swelling ratio} = \frac{W_0 - W_1}{W_1}$$

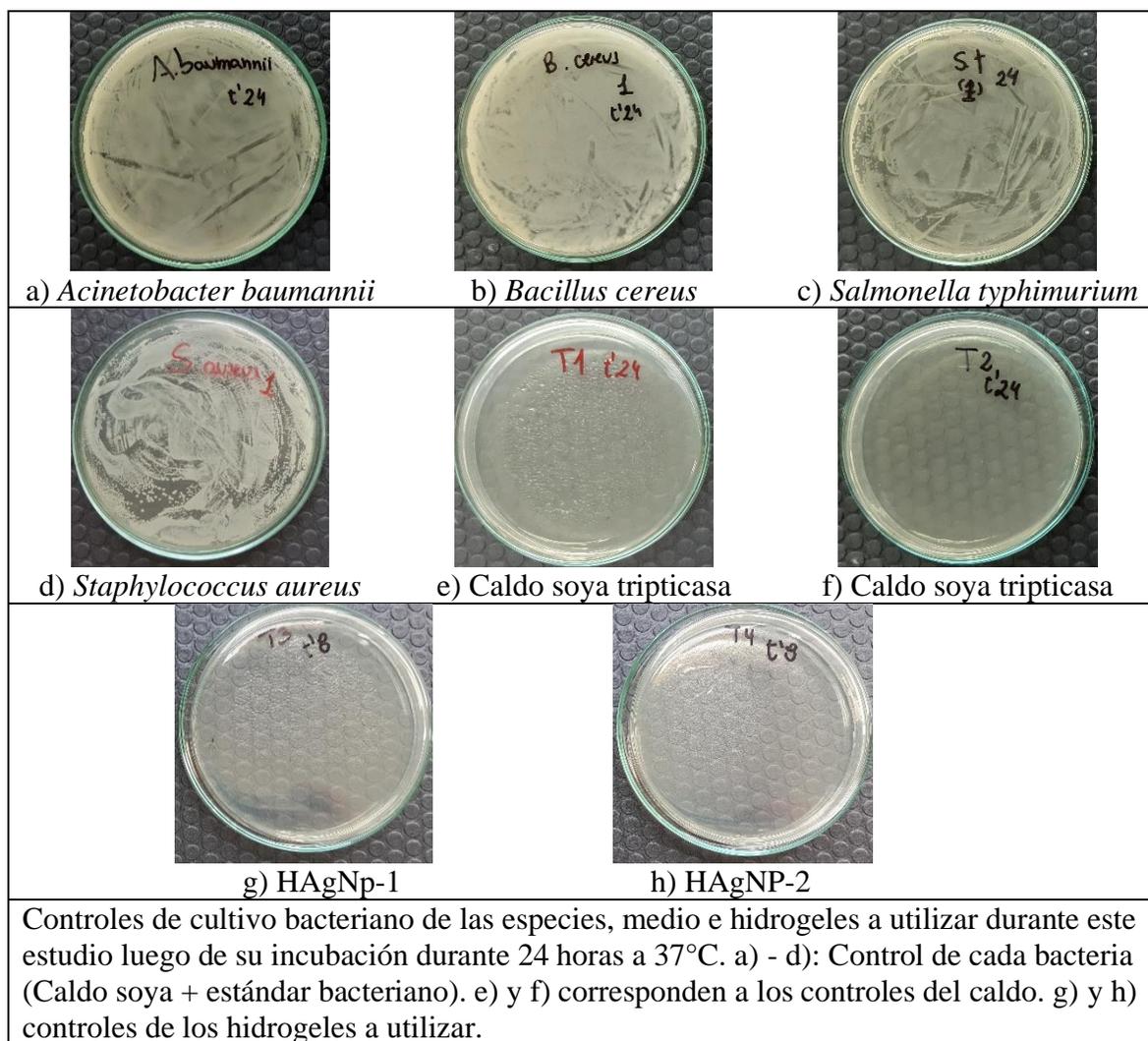
Donde:  $W_0$  es el peso inicial y  $W_1$ , el peso pasadas las 24 horas.

**Tabla 6.** Cálculo de Swelling ratio de cada hidrogel sintetizado

	Tiempo 0 hrs	Tiempo 24 hrs	Swelling ratio
HC-3	0,0243 g	4,3104 g	17638,27%
HAgNP-1	0,0151 g	3,7118 g	24481,46%
HAgNP-2	0,0202 g	4,2011 g	20697,52%
HAgNP-3	0,0215 g	2,4342 g	11221,86%

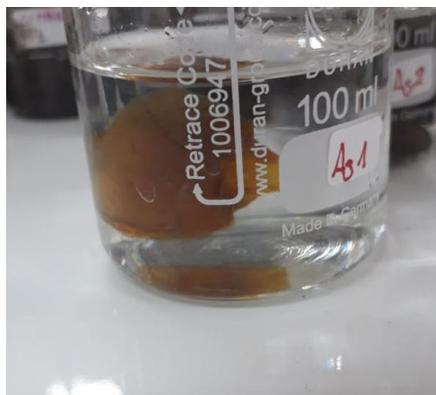
### 8.3. Anexo 3: Controles actividad antimicrobiana

**Tabla 7.** Controles de cultivo bacteriano del método de estudio cuantitativo de la actividad antimicrobiana.

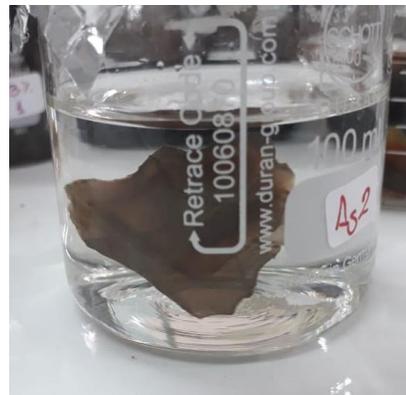


A través de la realización de los controles positivo (a – d) de cada bacteria, se aseguró la viabilidad de estas. Los controles negativos (e-f) ayudaron a descartar contaminantes en el caldo como en los hidrogel.

#### 8.4. Anexo 4: Presencia de nanopartículas de plata en hidrogeles de AS



*Figura 8. HAgNP-1*



*Figura 9. HAgNP-2*



*Figura 10. HAgNP-3 y HC-3*

Se puede observar en la **figura 9 y 10** la presencia del color característico de la presencia de las nanopartículas de plata en los hidrogeles HAgNP-1 y HAgNP-2 tras la reducción del ion plata con el extracto de jengibre. Por otra parte, en la **figura 11** se aprecia el contraste de un hidrogel con plata y el otro sin ella.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(9):1265-73.
2. OMS. Resistencia a los antibióticos: OMS; 2018 [Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>].
3. MINSAL. Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos Santiago, Chile 2017 [Available from: <https://www.minsal.cl/plan-nacional-contr-la-resistencia-a-los-antimicrobianos/>].
4. Harrison JJ, Ceri H, Stremick CA, Turner RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*. 2004;6(12):1220-7.
5. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(6):371-84.
6. Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;51(6):730-50.
7. Nwokocha C, Owu D, I Nwokocha M, Ufearo C, O E Iwuala M. Comparative study on the hepatoprotection to heavy metals of *Zingiber Officinale*. *Pharmacognosy research*. 2012;4:208-13.
8. Nuran E, Hande Gurer-Orhan and Nukhet A-B. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Me-tal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001;1(6):529-39.
9. Shahid ul I, Butola BS, Verma D. Facile synthesis of chitosan-silver nanoparticles onto linen for antibacterial activity and free-radical scavenging textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;133:1134-41.
10. Cardoso PC. Nanoparticulas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev Hosp Niños (Buenos Aires)*. 2016;58:19-28.
11. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;112(5):841-52.
12. Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Medicine*. 1999;5(2):183-8.
13. Leaper D. Appropriate use of silver dressings in wounds: International consensus document. *International Wound Journal*. 2012;9(5):461-4.
14. Hartemann P, Hoet P, Proykova A, Fernandes T, Baun A, De Jong W, et al. Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *Materials Today*. 2015;18(3):122-3.
15. Ge LP, Li QT, Wang M, Ouyang J, Li XJ, Xing MMQ. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9:2399-407.
16. Cardoso PC. Nanoparticulas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev Hosp Niños (Buenos Aires)*. 2016;58(260):19-28.
17. Jayaramudu T, Varaprasad K, Raghavendra GM, Sadiku ER, Raju KM, Amalraj J. Green synthesis of tea Ag nanocomposite hydrogels via mint leaf extraction for effective antibacterial activity. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*. 2017;28(14):1588-602.
18. Babaladimath G, Badalamoole V. Silver nanoparticles embedded pectin-based hydrogel: a novel adsorbent material for separation of cationic dyes. *Polymer Bulletin*. 2019;76(8):4215-36.
19. Lara HH, Garza-Trevino EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011;9.

20. Knetsch MLW, Koole LH. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*. 2011;3(1):340-66.
21. Percival SL, Bowler PG, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *International Wound Journal*. 2007;4(2):186-91.
22. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(10):2346-53.
23. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856-74.
24. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(33):16248-53.
25. Wang LL, Hu C, Shao LQ. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:1227-49.
26. Handoko CT, Huda A, Gulo F. Synthesis Pathway and Powerful Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticle: A Critical Review. *Asian Journal of Scientific Research*. 2019;12:1-17.
27. Şen Karaman D, Manner S, Fallarero A, Rosenholm JM. Current Approaches for Exploration of Nanoparticles as Antibacterial Agents. Ranjith N Kumavath, IntechOpen. 2017.
28. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7.
29. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;275(1):177-82.
30. Bondarenko OM, Sihtmae M, Kuzmiciova J, Rageliene L, Kahru A, Daugelavicius R. Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*. 2018;13:6779-90.
31. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li QL, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2555-62.
32. Kim S-H, Lee H-S, Ryu D-S, Choi S-J, Lee D-S. Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011;39(1):77-85.
33. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):7589-93.
34. Qing YA, Cheng L, Li RY, Liu GC, Zhang YB, Tang XF, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*. 2018;13:3311-27.
35. Klueh U, Wagner V, Kelly S, Johnson A, Bryers JD. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;53(6):621-31.
36. McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN. SALMONELLA TYPHIMURIUM RESISTANT TO SILVER-NITRATE, CHLORAMPHENICOL, AND AMPICILLIN - NEW THREAT IN BURN UNITS. *Lancet*. 1975;1(7901):235-40.
37. Hasan H, Raauf A, Abd Razik B. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Crude Extracts Isolated from *Zingiber Officinale* by Different Solvents. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2012;3.
38. Ji K, Fang L, Zhao H, Li Q, Shi Y, Xu C, et al. Ginger Oleoresin Alleviated  $\gamma$ -Ray Irradiation-Induced Reactive Oxygen Species via the Nrf2 Protective Response in Human Mesenchymal Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-12.

39. Mao Q-Q, Xu X-Y, Cao S-Y, Gan R-Y, Corke H, Beta T, et al. Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*. 2019;8(6):185.
40. Ratcharin N, Wongtrakul P, Indranupakorn R. Preparation of *Zingiber Officinale* Extract Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Advanced Materials Research*. 2012;506:389-92.
41. Ghasemzadeh H, Ghanaat F. Antimicrobial alginate/PVA silver nanocomposite hydrogel, synthesis and characterization. *Journal of Polymer Research*. 2014;21(3):14.
42. Bahram M, Mohseni N, Moghtader M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels: Sutapa Biswas Majee*; 2016.
43. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*. 2015;6(2):105-21.
44. Escobar JL, García DM, Zaldivar D, Katime I. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana Polímeros Escobar et al*. 2002;3(3).
45. González Velázquez X. Diseño, síntesis y caracterización Físioquímica de un hidrogel nanofuncionalizado basado en polietilenglicol. Toluca, Estado de México: Universidad autónoma del Estado de México; 2016.
46. Raphael O, Kinam P, Teruo O, Rolando B, Arthur C, Haruma K, et al. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. w York: Springer Science+Business Media; 2010. 432 p.
47. Díez Peña E. Desarrollo y Caracterización de Hidrogeles Poliméricos con Aplicación en la Liberación Controlada de Fármacos. Madrid (España): Universidad Complutense de Madrid; 2002.
48. Soto D, Oliva H. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 2012;32:154-75.
49. García D, Escobar J, Bocourt M, Bada N, Zaldivar D, Katime I. Influencia del agente entrecruzante y la composición en hidrogeles de poli (ácido itacónico-co-ácido metacrílico). *Iberoamericana de Polímeros*. 2003;4(1):93-105.
50. Hashmi S, Nadeem S, Awan Z, Rehman AU, Ghani AA. Synthesis, Applications and Swelling Properties of Poly (Sodium Acrylate-Coacrylamide) Based Superabsorbent Hydrogels. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 2019;41(4):668-78.
51. Pele F. Obtención y caracterización de geles para su utilización como andamios en ingeniería de tejidos. España: Universidad Politécnica de Catalunya; 2002.
52. Valenzuela B R, Ronco M AM. ACRILAMIDA EN LOS ALIMENTOS. *Revista chilena de nutrición*. 2007;34:8-16.
53. Jiménez Pardo I. Hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables derivados de Pluronic ® para aplicaciones biomédicas. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2014.
54. Yu L, Ding JD. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*. 2008;37(8):1473-81.
55. Kshitij G, Singhal R. A Review: Tailor-made Hydrogel Structures (Classifications and Synthesis Parameters). *Polymer-plastic Technology and Engineering*. 2015;55(1):54-70.
56. Narayan Swami S. Radiation Synthesis of Polymeric Hydrogels for Swelling-controlled Drug Release Studies. Australia: University of Western Sydney New South Wales; 2004.
57. Mohite PB, Adhav S. A hydrogels: Methods of preparation and applications. 2017;6(3):79-85.
58. García Zapata JA. Redes poliméricas interpenetradas de poli (metacrilato de 2-Hidroxietilo-co-acido itaconico) y quitosano como matriz de liberación controlada. Santiago de Cali: Maestría en Formulación de Productos químicos y derivados; 2019.
59. Zhu JL, Wang R, Geng R, Zhang X, Wang F, Jiao TF, et al. A facile preparation method for new two-component supramolecular hydrogels and their performances in adsorption, catalysis, and stimuli-response. *Rsc Advances*. 2019;9(39):22551-8.

60. Shojaeiarani J, Bajwa D, Shirzadifar A. A review on cellulose nanocrystals as promising biocompounds for the synthesis of nanocomposite hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 2019;216:247-59.
61. Navroski MC, Araujo MM, Fior CS, Cunha FD, Berghetti ALP, Pereira MD. Hidrogel enables use of reduction of irrigation and improves the inicial grownth of Eucalyptus dunnii Maiden seedlings. *Scientia Forestalis*. 2015;43(106):467-76.
62. Wu Y, Jiao L, Xu WQ, Gu WL, Zhu CZ, Du D, et al. Polydopamine-Capped Bimetallic AuPt Hydrogels Enable Robust Biosensor for Organophosphorus Pesticide Detection. *Small*. 2019;15(17):8.
63. Zhao H, Xu JB, Huang WJ, Zhao YB, Yang XL. Thermosensitive Nanogels with Cross-Linked Pd(II) Ions for Improving Therapeutic Effects on Platinum-Resistant Cancers via Intratumoral Formation of Hydrogels. *Chemistry of Materials*. 2019;31(14):5089-103.
64. Li JY, Pan H, Qiao S, Li YJ, Wang J, Liu W, et al. The utilization of low molecular weight heparin-poloxamer associated Laponite nanoplatform for safe and efficient tumor therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;134:63-72.
65. Aurand ER, Lampe KJ, Bjugstad KB. Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neuroscience Research*. 2012;72(3):199-213.
66. Aurand ER, Wagner JL, Shandas R, Bjugstad KB. Hydrogel formulation determines cell fate of fetal and adult neural progenitor cells. *Stem Cell Research*. 2014;12(1):11-23.
67. Cooper RC, Yang H. Hydrogel-based ocular drug delivery systems: Emerging fabrication strategies, applications, and bench-to-bedside manufacturing considerations. *Journal of Controlled Release*. 2019;306:29-39.
68. Li JY, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*. 2016;1(12).
69. Li BG, Wu C, Wang CY, Luo ZY, Cao JP. Fabrication of tough, self-recoverable, and electrically conductive hydrogels by in situ reduction of poly(acrylic acid) grafted graphene oxide in polyacrylamide hydrogel matrix. *Journal of Applied Polymer Science*. 2020;137(23).
70. Kiran, Tiwari R, Krishnamoorthi S, Kumar K. Synthesis of cross-linker devoid novel hydrogels: Swelling behaviour and controlled urea release studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019;7(4):8.
71. Ali AEH, Shawky HA, Abd el Rehim HA, Hegazy EA. Synthesis and characterization of PVP/AAC copolymer hydrogel and its applications in the removal of heavy metals from aqueous solution. *European Polymer Journal*. 2003;39(12):2337-44.
72. Elizondo SG, Mendoza DS. Desarrollo de Hidrogeles de alginato para úlceras diabéticas. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2018.
73. González Alvarado E. Estabilidad e Intercambio de Iones Calcio en Geles de Alginato. 2009:1-44.
74. Al-Kahtani AA, Sherigara BS. Semi-interpenetrating network of acrylamide-grafted-sodium alginate microspheres for controlled release of diclofenac sodium, preparation and characterization. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2014;115:132-8.
75. Siwek H, Bartkowiak A, Włodarczyk M. Adsorption of Phosphates from Aqueous Solutions on Alginate/Goethite Hydrogel Composite. *Water*. 2019;11(4):13.
76. Jayaramudu T, Raghavendra GM, Varaprasad K, Sadiku R, Raju KM. Development of novel biodegradable Au nanocomposite hydrogels based on wheat: For inactivation of bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 2013;92(2):2193-200.
77. Manjula B, Varaprasad K, Sadiku R, Raju KM. Preparation and Characterization of Sodium Alginate-Based Hydrogels and Their In Vitro Release Studies. *Advances in Polymer Technology*. 2013;32(2):12.
78. Avendaño Romero GC, López Malo A, Palou E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2013;7(1):87-96.

79. Alvarado González E. Estabilidad e Intercambio de Iones Calcio en Geles de Alginato. 2009;1-44.
80. Qin Y. Seaweed Hydrocolloids as Thickening, Gelling, and Emulsifying Agents in Functional Food Products. *Bioactive Seaweeds for Food Applications*, Academic Press 2018:135-52.
81. Yang N, Li FY, Jian TC, Liu CC, Sun HS, Wang L, et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using ginger (*Zingiber officinale*) extract and their antibacterial properties against aquatic pathogens. *Acta Oceanologica Sinica*. 2017;36(12):95-100.
82. Huang HZ, Yang XR. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydrate Research*. 2004;339(15):2627-31.
83. Sadeghi B, Gholamhoseinpoor F. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;134:310-5.
84. Trung ND, Nhuan NT, Van LTC, Minh NV, Anh NP, Tri N. Biofabrication of silver nanoparticles using *Curcuma longa* extract: Effects of extraction and synthesis conditions, characteristics, and its antibacterial activity. *Journal of Biochemical Technology*. 2020;11(1):57-66.
85. Fatimah I, Afrid Z. Characteristics and antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles using red spinach (*Amaranthus Tricolor L.*) leaf extract. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2019;12(1):25-30.
86. Bhagyaraj S, Krupa I. Alginate-Mediated Synthesis of Hetero-Shaped Silver Nanoparticles and Their Hydrogen Peroxide Sensing Ability. *Molecules*. 2020;25(3).
87. Zhang YX, Wu FP, Li MZ, Wang EJ. pH switching on-off semi-IPN hydrogel based on cross-linked poly(acrylamide-co-acrylic acid) and linear polyallylamine. *Polymer*. 2005;46(18):7695-700.
88. Karadag E, Kasim ZD, Kundakci S, Uzum OB. Acrylamide/Potassium 3-sulfopropyl Methacrylate/Sodium Alginate/Bentonite Hybrid Hydrogels: Synthesis, Characterization and Its Application in Lauths Violet Removal from Aqueous Solutions. *Fibers and Polymers*. 2017;18(1):9-21.
89. Arredondo Peñaranda A, Londoño López ME. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*. 2009;3(5):83-94.
90. Rao KM, Rao K, Ramanjaneyulu G, Rao KC, Subha MCS, Ha CS. Biodegradable sodium alginate-based semi-interpenetrating polymer network hydrogels for antibacterial application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(9):3196-206.
91. Basu S, Samanta HS, Ganguly J. Green synthesis and swelling behavior of Ag-nanocomposite semi-IPN hydrogels and their drug delivery using *Dolichos biflorus* Linn. *Soft Materials*. 2018;16(1):7-19.
92. Rodríguez Delgado MG. Estudio de la incorporación y dispersión de nanopartículas de plata en recubrimientos poliméricos a base de hidrogeles y su efecto en las propiedades antimicrobianas. Saltillo, Coahuila: Centro de investigación en Química Aplicada; 2010.
93. Bulut E, Sanli O. Novel ionically crosslinked acrylamide-grafted poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose pH-sensitive microspheres for delivery of Alzheimer's drug donepezil hydrochloride: Preparation and optimization of release conditions. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*. 2016;44(2):431-42.
94. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;52(4):662-8.