

# Síntesis Ultra-asistida y Actividad Antibacterial de Nanopartículas de Plata Estabilizadas con Ácido Gálico y Quitosano

Katherine Guzmán  
[kguzman@tecnologicosucree.edu.ec](mailto:kguzman@tecnologicosucree.edu.ec),  
Carrera de Gestión Ambiental  
Instituto Superior Tecnológico Sucre, Quito, Ecuador

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue sintetizar nanopartículas de plata utilizando ácido gálico como antioxidante y Quitosano (GC-AgNps) bajo la influencia de la irradiación con ultrasonido, y posteriormente, evaluar el efecto antimicrobiano mediante concentración mínima de inhibición (MIC) y eficacia antimicrobiana (ABE) contra *Escherichia coli*, bacteria más común en agua, suelo y aire. Este método ecológico para la síntesis de nanopartículas coloidales fue desarrollado por reducción química y ultrasonido. El mecanismo de acción de la toxicidad sugiere que AgNps puede inhibir la respiración colectiva de los microbios por especies reactivas de oxígeno (ROS) con casi el doble de eficiente que el nitrato de plata en solución acuosa. Por otro lado, una estrategia de estabilización de la nanopartícula monodispersa obtenida fue gracias a las propiedades del quitosano como alternativa no tóxica y amigable con el medio ambiente. Se conoce que el quitosano es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. En esta investigación, el quitosano domina la carga de la superficie y el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula, así como controlar la formación de complejos con otras biomoléculas y eventualmente la interacción Bacterias-Nanopartículas. Los resultados revelaron que las GC-AgNps sintetizadas fueron monodispersas, de forma esférica con un tamaño promedio de  $26.23 \pm 9.92$  nm, y estables durante cuatro semanas sin ningún cambio notable en el tamaño. El análisis de difracción de rayos X (XRD) y la espectroscopia infrarroja (FTIR) confirmaron que las GC-AgNps son estructuras cristalinas cúbicas centradas en la cara (FCC) y las vibraciones de Ag-O más destacadas a  $599\text{ cm}^{-1}$ . Además, se demostró que la sensibilidad y muerte celular causada por GC-AgNps contra *Escherichia coli* Log CFU 2.4 fue de  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  después de 45 minutos de exposición.

**Palabras Clave:** Síntesis verde asistida por ultrasonido, nanopartícula de plata, quitosano-ácido gálico, actividad microbiana, UV-VISIBLE, FTIR, XRD, TEM, SEM.

## Abstract

The aim of this work was to synthesize AgNps using gallic acid as an antioxidant and Chitosan (GC-AgNps) under the influence of ultrasound irradiation, and subsequently to evaluate the antimicrobial effect through (MIC) and (ABE) against *Escherichia coli*, the most common bacterium in water, soil and air. The mechanism of action of toxicity indicates that microbes can inhibit the collective respiration by reactive oxygen reactions (ROS) with almost twice as efficient as silver nitrate in an aqueous solution. On the other hand, a strategy of stabilization of the dispersed mono nanoparticle was based on the properties of chitosan as a non-toxic and environmentally friendly alternative. It is known that chitosan is the second most abundant biopolymer in nature after cellulose. In this research, chitosan dominates the surface charge and the hydrodynamic diameter of the nanoparticle, as well as controlling the formation of complexes with other

biomolecules and eventually the Bacteria-Nanoparticle interaction. The results revealed that the GC-AgNps synthesized were monodisperse, spherical with an average size of  $26.23 \pm 9.92$  nm, and stable for four weeks without no change. Analysis of X-ray diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (FTIR) confirm that GC-Ags are crystalline structures (FCC) and the most prominent Ag-O vibrations at  $599\text{ cm}^{-1}$ . In addition, the sensitivity and total cell death caused by GC-AgNps against *Escherichia coli* at Log CFU 2.4 was  $10\ \mu\text{g} / \text{ml}$  after 45 minutes of exposure.

**Keywords:** *Ultrasound-assisted green synthesis, Silver nanoparticles, Chitosan-Gallic acid Antibacterial activity, UV-VISIBLE, FTIR, XRD, TEM, SEM*

## Introducción

Las nanopartículas de plata (AgNP) son conocidas por sus aplicaciones microbianas en artículos comunes domésticos y su uso en productos comerciales como aditivos antisépticos en envases, tela, revestimiento de azulejos y ha ido aumentando en los últimos años [1].

Sin embargo, la estabilización y las propiedades de las AgNps se ven afectadas debido a varias características físicas y químicas [2,3]. Se ha demostrado que las AgNps con una alta relación de área superficial a volumen y alta estabilidad térmica son más eficaces como antibacterianos que la plata a granel [3,4]. El mecanismo de acción de la toxicidad sugiere que las AgNps pueden inhibir la respiración colectiva de los microbios por especies reactivas de oxígeno (ROS) con casi el doble de eficiencia que los iones de plata [5].

Por otro lado, la estrategia después de la síntesis para estabilizar las nanopartículas monodispersas ha sido generada por surfactantes y polímeros [6]. Incluye polivinilpirrolidona [7], almidón [8], celulosa [9], agar [10], líquido iónico soportado de sílice [11], quitosano [12], etc. Entre todos, el quitosano se considera no tóxico, amigable con el medio ambiente y muy accesible [13].

El quitosano se encuentra en las conchas y exoesqueletos de los crustáceos y se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina [14]. Es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y ha sido utilizado en aplicaciones biomédicas, farmacéuticas e industriales debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja citotoxicidad [15,16]. Algunos estudios afirman que el quitosano puede dominar la carga de la superficie de las nanopartículas y controlar la formación de complejos con otras biomoléculas y, finalmente, la interacción bacterias-nanopartículas [17,18]. La conversión entre nanopartículas y matriz de quitosano como agente estabilizador se emplea para evaluar el efecto a largo plazo y las soluciones coloidales estables de AgNps en los medios de cultivo bacterianos [19].

Los métodos utilizados en esta investigación han sido amigables con el ambiente mediante reducción química y ultrasonido convirtiéndose en una combinación deseable de materiales biocidas en condiciones ecológicas y de fácil producción.

## Metodología

### Materiales

El nitrato de plata, AgNO<sub>3</sub>, 99.0% fue adquirido de Spectrum, EE. UU. Quitosano de conchas de camarón (grado analítico, > 75% desacetilados) y ácido gálico (97.5–100.2% de titulación) de Sigma-Aldrich Alemania y China, respectivamente.

### Preparación de GC-AgNPs.

La síntesis de GC-AgNps se llevó a cabo utilizando ácido gálico y quitosano como agente reductor y estabilizante, respectivamente. El procedimiento de preparación de AgNps implica la mezcla de ácido gálico (1 mM, 4 ml) con AgNO<sub>3</sub> (1 mM, 20 ml) con una relación de 1: 5 y el pH se incrementó a 11 mediante la adición de 0,1 M de NaOH. Luego, se agregaron 4 ml de solución de quitosano al 0,5% a la mezcla de reacción y se sometieron a ultrasonido durante 10 y 20 minutos usando un procesador ultrasónico (DAIGGER GE 505, 500 W, 20 kHz) sumergido directamente en la solución de reacción. La condición operativa fue de 30 s en pulso encendido/ 30 s en reposo con una amplitud de 72% a 25°C.

La solución de quitosano se preparó mezclando 0,5 g de quitosano con 100 ml de ácido acético (1% v/v) y se mantuvo bajo agitación durante tres días, para permitir la disolución completa y evitar su gelificación.

### Caracterización de las GC-AgNPs.

Las muestras que contenían GC-AgNps se confirmaron con un espectrofotómetro UV-vis, SPECORD® S600 de Analytik Jena, Alemania. Además, la distribución de tamaño de la muestra hidrodinámica se analizó en un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS) del analizador de distribución de tamaño HORIBA LB-550.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el patrón de separación de electrones del área seleccionada (SAED) de las nanopartículas se capturaron de FEI Tecnai, G2 Spirit Twin. La morfología de la superficie y el mapeo elemental de AgNps se registraron digitalmente utilizando SEM, (TESCAN, MIRA 3). Los análisis de la radiación de rayos X (DRX) se realizaron con un tubo de rayos X de configuración PANalytical de  $\theta$ -2 $\theta$  (generador-detector), cobre  $\lambda=1.54059$  Å y diámetro EMPYREAN. Espectroscopia infrarroja (FTIR), las mediciones se realizaron en un espectrómetro Spectrum 100 IR (Perkin Elmer, EE. UU.), empleando la técnica de la reflectancia total atenuada (ATR) para determinar la posible participación de grupos funcionales.

### Estudio Antibacterial

La actividad antibacteriana de las GC-AgNps sintetizadas se evaluó contra el modelo Gram-negativo, *E. coli* ATCC 10536, que se cultivó en caldo LB. Cuando el crecimiento de las bacterias alcanzó una base Log 7.02 UFC/ml, se tomó 900  $\mu$ L del inóculo con 100  $\mu$ L de GC-AgNps en concentraciones previamente diluidas de 100  $\mu$ g/mL a 0.01  $\mu$ g/mL en diferentes tubos de ensayo. Las muestras se incubaron a 37°C en condiciones de agitación en intervalos de tiempo: 15, 45, 120 minutos respectivamente. Por cada intervalo de tiempo, se tomó una alícuota de

100 µL de cada muestra y se extendió sobre placas de agar para su respectivo conteo celular. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

El control positivo no contenía ninguna solución de GC-AgNps con el mismo límite de detección en una placa. El control negativo fue nanopartículas diluidas en caldo y repartidas en una placa. El efecto microbicida (ME) se calculó con una tasa de reducción logarítmica de cada tratamiento siguiendo la fórmula  $ME = \log V_c - \log V_t$ , [20]. Donde  $V_c$  es el número de CFU como control positivo y  $V_t$  de experimentos. Por otro lado, la eficacia antibacteriana (ABE en%) de la muestra se calculó como el porcentaje de inhibición del crecimiento de bacterias después de la adición de nanopartículas  $ABE = (V_c - V_t) / V_c \times 100$ , [21]. Donde  $V_c$  fue el número de colonias bacterianas viables del control positivo y  $V_t$ , las colonias analizadas por cada tratamiento. Los cambios morfológicos después de la adición de nanopartículas de plata se observaron en microscopía TEM.

### **Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó ANOVA seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el software OriginPro versión 8.0.

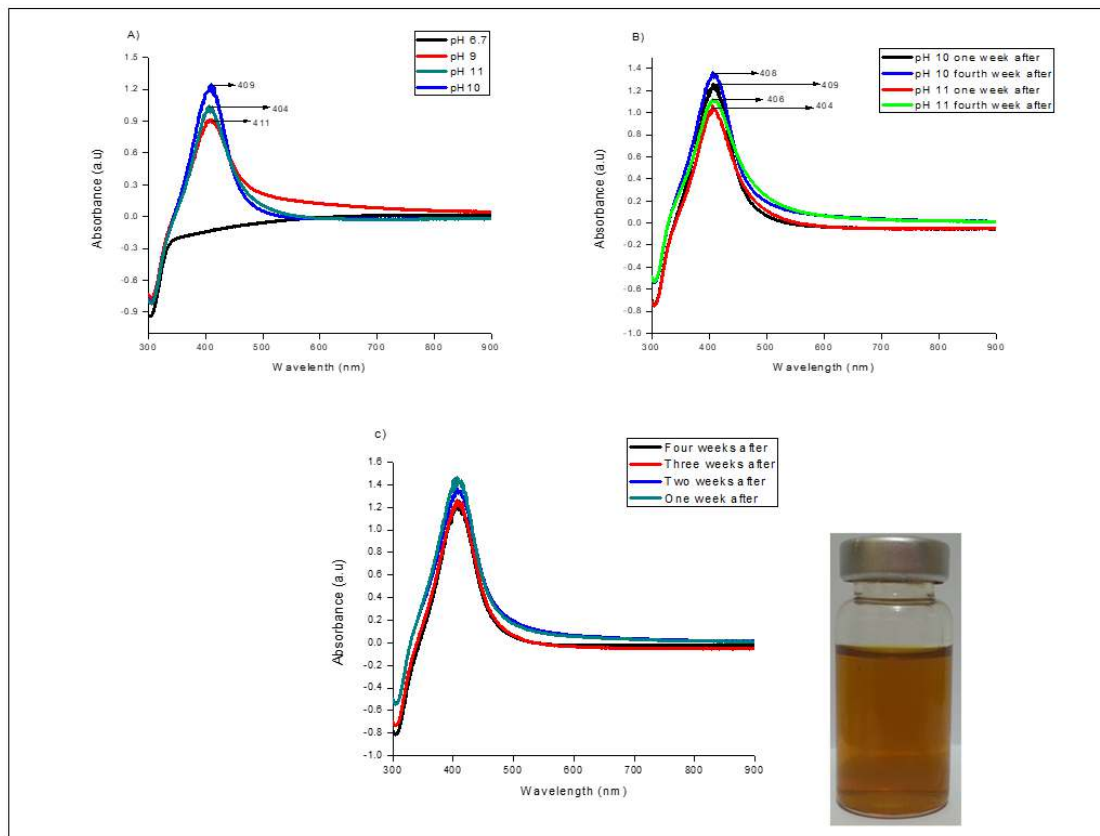
### **Resultados**

La formación de AgNps con ácido gálico (CG-AgNps) requirió condiciones alcalinas (pH 11).

### **Análisis de Espectrofotometría UV-Visible**

Para monitorear la estabilidad de los GC-AgNps, se midió los espectros de absorción SPR de los GC-AgNps (almacenados a 23–25 °C) durante 10 minutos, 7, 14, 21 y 28 días (**Fig. 1**). Estos picos se desplazaron de 411 nm a 406 nm, y su coloración fue amarillo como se muestra en la misma figura. demostrando interacción de plata Los espectros de absorción visual y UV-vis de las soluciones de GC-AgNps se mostraron en la Fig. 1. La banda SPR puede proporcionar información útil sobre la forma y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Este rango sugiere la formación de AgNps son pequeños y esféricos [22]. El rango de banda estrecha indicó una distribución de tamaño reducido de AgNPs [23]. Los resultados fueron confirmados por el análisis DLS de 7 a 28 días.

Figura 1. Formación de GC AgNps y espectrofotometría UV-visible



### Análisis DLS

La distribución del tamaño de partícula hidrodinámica de los GC-AgNps obtenidos de las mediciones de DLS se muestra en la Tabla 1. El tamaño promedio de los GC-AgNps durante 10 y 20 minutos de ultrasonidos por 7 días es  $29.78 \pm 10.2$  nm y  $54.90 \pm 64.8$  nm. **La Tabla 1** mostró claramente que el diámetro de GC-AgNps se incrementó al aumentar el tiempo de ultrasonido y el tiempo de incubación a temperatura ambiente. Por lo tanto, la muestra necesita únicamente 10 minutos de ultrasonido para mantener el quitosano como agente protector.

Tabla 1:

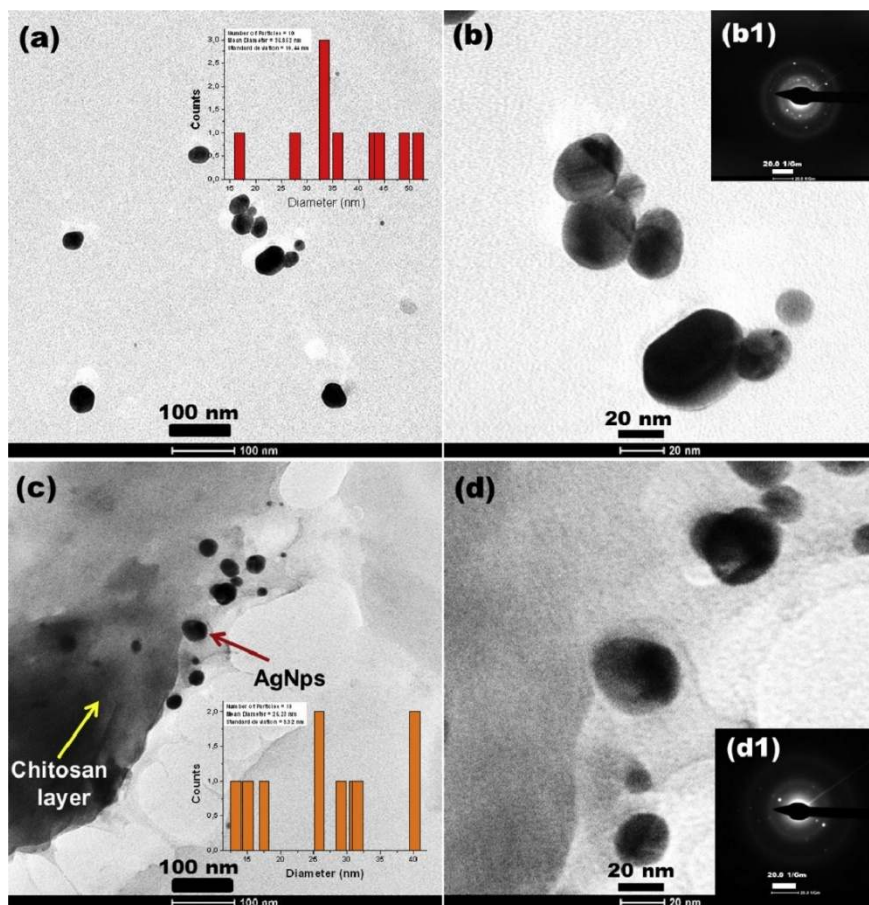
*Diámetro y desviación estándar de la nanopartícula después de 28 días de estabilización en estudio DLS*

Condición inicial	Diámetro de partícula ( $\mu \pm \sigma$ )nm Tiempo: 7 días	Diámetro de partícula ( $\mu \pm \sigma$ )nm Tiempo: 14 días	Diámetro de partícula ( $\mu \pm \sigma$ )nm Tiempo: 21 días	Diámetro de partícula ( $\mu \pm \sigma$ )nm Tiempo: 28 días
10 min ultrasonido	$29.78 \pm 10.2$	$31.2 \pm 12.1$	$35.3 \pm 16.1$	$46.5 \pm 19.76$
20 min ultrasonido	$54.90 \pm 64.8$	$51.50 \pm 3.61$	$52.40 \pm 3.93$	$58.60 \pm 4.01$



## Microscopia TEM y SEM

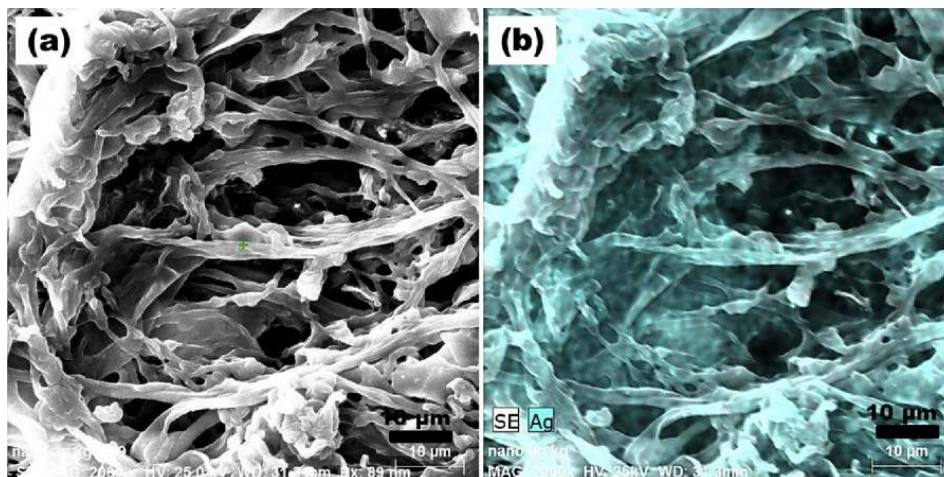
Las propiedades de la superficie de las GC-AgNps se analizaron utilizando la técnica TEM y SEM. En la **Fig. 2(a-b)**, el análisis de TEM confirma que el Ácido gálico reducido AgNps es una forma esférica, bien dispersa y que tiene un tamaño promedio de  $36.85 \pm 10.44$  nm. Pero después de agregar quitosano al ácido gálico reducido, el tamaño de partícula de GC-AgNps disminuyó ligeramente y el tamaño promedio observado fue de  $29.78 \pm 10.2$  nm. Puede deberse a la estabilización de AgNps formando un recubrimiento externo de partículas con quitosano. **Fig 2 (c-d)**, la matriz de este biopolímero mantuvo una partícula monodispersa, prohibiendo la aglomeración, y evitó la oxidación de la superficie en el momento de la dilución en medio iónico en medios de cultivo. Por tanto, la estabilidad no cambió, ya que la nucleación mantenida de los átomos de plata y las partículas no se aglomeraron.



*Figura 2. Microscopia electrónica TEM y tamaño de partícula. (a-b) AgNps utilizando ácido gálico. (c-d) AgNps cubiertas con el quitosano como agente protector.*

Las imágenes SEM, incluido el mapeo EDX de GC-AgNps, se muestran en la **Fig. 3 (a, b)**. El color azul representa la existencia de GC-AgNps en la superficie del quitosano. Mostró claramente la presencia de plata metálica bien dispersa en forma GC-AgNps en la superficie del quitosano.

*Figure 3. Microscopia electrónica SEM (a) GC-AgNps con matriz de quitosano (b) mapa elemental de la plata con el quitosano.*



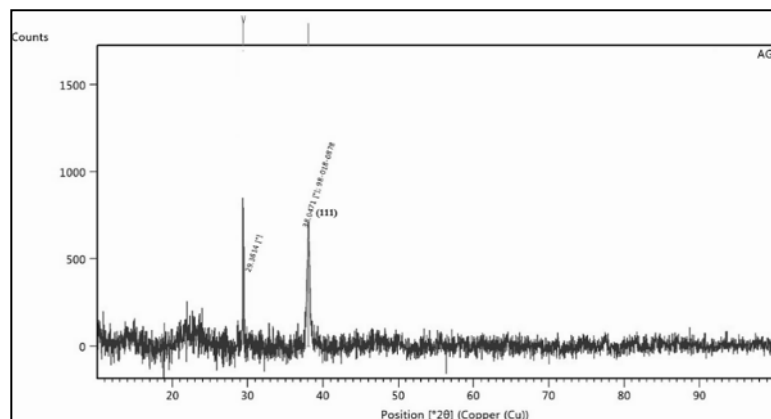
### Análisis XRD y FTIR

Las propiedades estructurales de las nanopartículas se analizaron utilizando la técnica XRD. Como se muestra en la **Fig. 4**, los picos de XRD comunes producidos por el ácido gálico redujeron los AgNps y GC-AgNps a  $38.04^\circ$  correspondientes a los planos (111) de la estructura cúbica centrada de plata metálica (ICSD no: 98-018-0878)(**Tabla 2**). Pero a  $2\theta = 29.36^\circ$ , el pico no se identificó como metal Ag y puede que la fase bioorgánica en la superficie de la partícula debido a la baja cristalinidad del quitosano. Por lo tanto, se cree que esos residuos orgánicos contenidos en las muestras [24] parecen actuar como un agente de cobertura para promover el crecimiento de las nanopartículas.

*Tabla 2:*  
*Picos indexados en patrones XRD de nanopartículas sintetizadas con ácido gálico y quitosano.*

Valores de posición pico $2\theta$ ( $^\circ$ )	D Å referencia	$1000/d^2$	$1000xd^2/60.62$	hkl	Metal detectado
29.36	3.040	108.20	1.78	-	No identificada
38.04	2.359	179.69	3	111	Plata

Figure 4. Espectro XRD de GC-AgNps sintetizadas



El espectro FTIR proporcionan información sobre los grupos funcionales de las moléculas orgánicas que podrían unirse a la superficie de las nanopartículas. En dicho espectro, se muestra que la banda ancha a 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos -OH y -NH<sub>2</sub> del ácido gálico y el quitosano. Además de eso, la banda alrededor de 599 y 509  $\text{cm}^{-1}$  confirma la existencia de un enlace Ag – O en las GC-AgNps. Por lo tanto, la posible estabilización de los grupos funcionales es mediante los grupos CH<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> + según **Tabla 3** [25].

Tabla 3:

Grupos funcionales destacados en FTIR de GC-AgNps

Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Equivalente químico	Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Equivalente químico
3870	-	Residuos de Quitosano	1844	C=O S unión	Acil
3803	-	Residuos de Quitosano	1549	N-H unión	Amidas
3753	O-H AND N-H unión	Aminas, fenoles, ácidos orgánicos	1346	R-NO <sub>2</sub> unión	Compuestos Nitro
3695	O-H unión	Alcohol y fenoles	992	=C-H unión	Alquenos
3535	N-H unión	Aminas	823	C-H unión	Compuestos Aromáticos
3271	C=O unión	Ácidos carboxílicos	763	C-H unión	Compuestos Aromáticos
2917	C-H unión	Alcanos	662	=C-H unión	Alquenos



## Efectividad antimicrobiana

Se utilizó diferentes intervalos de tiempo para determinar si el efecto antibacteriano de GC-AgNps era bacteriostático o bactericida. La bacteriostática incluye eliminar y prevenir el crecimiento de bacterias dependiendo de las concentraciones del agente, cuyas acciones son reversibles. Mientras que el efecto bactericida incluye matar las bacterias, y sus acciones son irreversibles [26,27]. Se demostró que 100  $\mu\text{g/mL}$  de la solución de nanopartículas puede eliminar bacterias Log CFU 7.5 en 15 min como se muestra en **Fig. 5. Toxicidad celular**

La toxicidad de las bacterias se observa en la **Fig. 6**. Se determinó que los GC-AgNPs no solo se unen a la membrana de peptidoglicano, pero también penetra en el protoplasma de las bacterias [28]. Se cree que el ADN pierde su capacidad de replicación y las proteínas celulares se inactivan con la plata ( $\text{Ag}^{\circ}$ ) y se une a los grupos funcionales, lo que resulta en la desnaturalización de proteínas [28].

Además, *E. coli* cuando están en contacto con GC-AgNps. Se especula que la barrera de lipopolisacáridos LPS puede ser completamente destruida. Se conoce que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo las más comunes, radicales de superóxido, hidroperoxilo, hidroxilo, óxido nítrico están relacionadas con el ahogamiento celular [29].

*Figure 5. CFU viables en platos de agar. (a) (i) control positivo, (ii) 100  $\mu\text{g/mL}$  (iii) 10  $\mu\text{g/mL}$  (iv) 1  $\mu\text{g/mL}$ , (v) 0.1  $\mu\text{g/mL}$  y (vi) 0.01  $\mu\text{g/mL}$ . (b-c) Análisis Log CFU para determinación de eficiencia antimicrobiana con diferentes concentración de AgNps sintetizadas con ácido gálico y quitosano.*

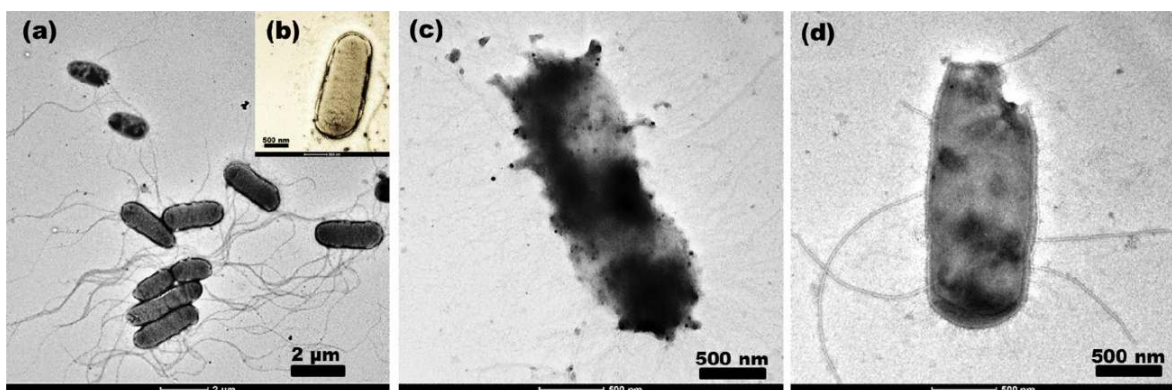
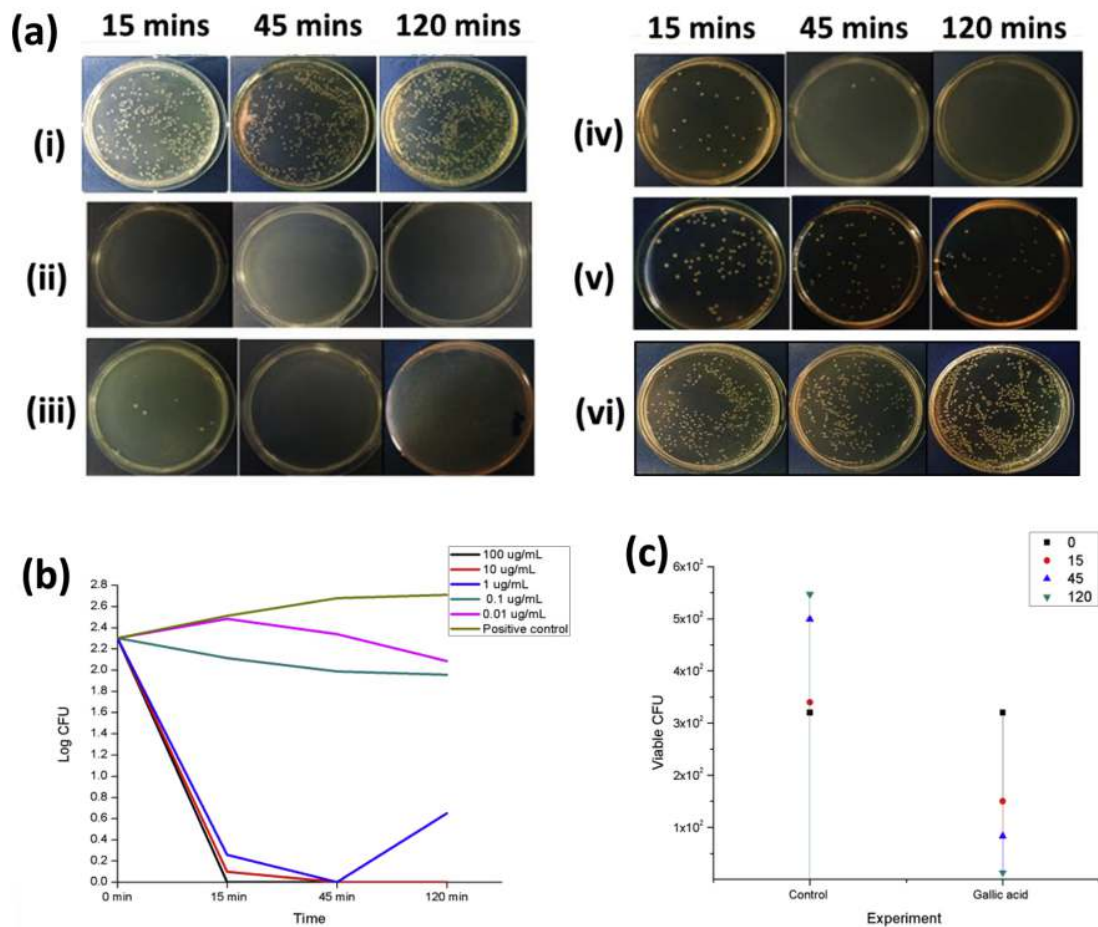


Figure 6. (a) control positivo, (b-c) Muerte celular después de la adición de GC-AgNPs



## Conclusiones y Discusión

Los GC-AgNps sintetizados se han caracterizado por diferentes técnicas espectroscópicas y microscópicas, utilizando la aplicación de ultrasonido, mejorando el transporte total de masa entre el quitosano y el ácido gálico se ha podido caracterizar las nanopartículas de plata eco amigables con el ambiente [30].

La energía suministrada por ultrasonidos para descomponer los aglomerados de quitosano después de la reducción de los iones  $Ag^+$  a  $Ag^0$  fue efectiva para producir GC-AgNps esféricos de tamaño controlado de un tamaño promedio de  $26.23 \pm 9.92$  nm. Además, también se sugiere que las GC-AgNps sintetizadas exhibieron potentes propiedades antibacterianas y efectos tóxicos contra *E. coli*.

Las nanopartículas a base de quitosano y ácido gálico, por otro lado, pueden tener un triple mecanismo de acción. El quitosano en sí mismo tiene actividad antimicrobiana [28] debido a sus propiedades catiónicas que causan la ruptura de la membrana, mientras que el ácido gálico presenta una resistencia a la oxidación. Claramente, estas nanopartículas tienen una combinación deseable para la eficacia antibacteriana, con baja toxicidad y fácil proceso de fabricación.

## Referencias

- [1] J. Gebauert, J. Malissek, S. Sonja, S. Knauer, M. Maskos, M. Stauber, L. Treuel, Impact of the nanoparticle–protein corona on colloidal stability and protein structure, *Langmuir* (2012) 9673–9679.
- [2] B. Nowack, H. Krug, M. Height, 120 years of nanosilver history: implications for policy makers, *Environ. Sci. Technol.* 45 (4) (2011) 1177–1183.
- [3] L. Chi-Ming, C. Rong, Q. He, Y. Yu, H. Sun, P. Tam, C. Che, Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2007) 527–534.
- [4] C. Okkyoung, K. Deng, K. Nam Jung, L. Ross, R. Surampalli, Z. Hu, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res.* (2008) 3066–3074.
- [5] M. Griffith, K. Udekwu, S. Gkotzis, T. Mah, E. Alarcon, Anti-microbiological and anti- infective activities of silver, *Silver Nanoparticle Applications*, Springer International Publishing Switzerland, New York, 2015, pp. 57–60 2015(2015).
- [6] D. Bragg, D. Rainiee, The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*, *Microbiology* (2006) 883–889.
- [7] A. Slistan-Grijalva, R. Herrera-Urbina, J.F. Rivas-Silva, M. Ávalos-Borja, F.F. Castellón- Barraza, A. Posada-Amarillas, Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol, *Mater. Res. Bull.* 43 (1) (2008) 90–96.
- [8] B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal, A. Debut, R.N. Pathak, Sonochemical synthesis of silver nanoparticles using starch: a comparison, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2014) 784268.
- [9] T. Mochochoko, O.S. Oluwafemi, D.N. Jumbam, S.P. Songca, Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 290–294.
- [10] P. Kanmani, J.W. Rhim, Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle anti- microbial composite films, *Food Chem.* 148 (2014) 162–169.
- [11] B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal, A. Debut, R.N. Pathak, Ionic liquid based silica tuned silver nanoparticles: novel approach for fabrication, *Synth. React. Inorg. Met. Nano Metal Chem.* 46 (2016) 1265–1271.
- [12] S. Kumar, P. Garg, S. Pandey, M. Kumari, S. Hoon, L.J. Jang, R. Kapavarapu, P.H. Choung, A.J.F.N. Sobral, J.H. Chung, Enhanced chitosan–DNA interaction by 2- acrylamido-2- methylpropane coupling for an efficient transfection in cancer cells, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3465–3475. X. Zhuang, X. Deng, B. Cheng, Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles in alkaline carboxymethyl chitosan solution, *Engineering* (2010) 387–390.
- [13] S. Kumar, M. Kumari, M.A. Mallick, B.S. Swain, A.J.F.N. Sobral, P.K. Dutta, Preparation and characterization of microporous bionanocomposites for biomedical applications, *Asian Chitin J.* 11 (1) (2015) 23–26.
- [14] S. Kumar, J. Koh, Physicochemical and optical properties of chitosan based graphene oxide bionanocomposite, *Int. J. Biol. Macromol.* 70 (2014) 559–564.
- [15] S. Kumar, V. Deepak, M. Kumari, P.K. Dutta, Antibacterial activity of diisocyanate-modified chitosan for biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 349–353.
- [16] R. Cushing, V. Kolesnichenko, J. O’Connor, Recent advances in the liquid-phase

- syntheses of inorganic nanoparticles, *Chem. Rev.* (2014) 3893–3946.
- [17] C. Sonnichsen, M. Reinhard, J. Liphardt, A. Alivisatos, A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticle, *Nat. Biotechnol.* (2005) 741–745.
- [18] S. Eckhardt, P.S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, K.M. Fromm, Nanobio silver: its interactions with peptides and Bacteria, and its uses in medicine, *Chem. Rev.* 113 (7) (2013) 4708–4754.
- [19] V. Saez, T. Mason, Sonoelectrochemical synthesis of nanoparticles, *Molecules* (2009) 4284–4299.
- [20] E. Tang, M. Huang, L. Lim, Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* (2003) 103–114.
- [21] B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal, A. Debut, Ultrasound agitated phytofabrication of pal- ladium nanoparticles using Andean blackberry leaf and its photocatalytic activity, *J. Saudi Chem. Soc.* (2015) 574–580.
- [22] S. Choubey, L. Varuhese, V. Kumar, V. Beniwal, L. Varuhese, Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review, *Pharm. Furture Sci.* (2015) 305–315.
- [23] D.Y. Young, J.S. Sung, M. Kim, G. Ghodake, Rapid production of silver nanoparticles at large-scale using gallic acid and their antibacterial assessment, *Mater. Lett.* 155 (2015) 62–64.
- [24] C.R. Arroyo, A. Debut, A.V. Vaca, S. Stael, K. Guzman, B. Kumar, L. Cumbal, Reliable tools for quantifying the morphological properties at the nanoscale, *Biol. Med. (Aligarh)* 8 (2016) 3, <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000281>) 2016.
- [25] B. Sadeghi, F. Garmaroudi, M. Hashemi, H. Nezhad, A. Nasrollahi, S. Ardalan, Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: nanoparticles, na- norods and nanoplates, *Adv. Powder Technol.* (2012) 22–26.
- [26] M.K. Choudhary, J. Kataria, S. Sharma, Evaluation of the kinetic and catalytic properties of biogenically synthesized silver nanoparticles, *J. Clean. Prod.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.201807.081> (in press).
- [27] N. Vigneshwaran, R.P. Nachane, R.H. Balasubramanya, P.V. Varadarajan, A novel one-pot ‘green’ synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 2012–2018.
- [28] N. Nigam, S. Kumar, P.K. Dutta, T. Ghose, Preparation and characterization of chitosan based silver nanocomposites as bio-optical material, *Asian Chitin J.* 5 (2009) 97–100.
- [29] B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal, A. Debut, *Ficus CARICA* (Fig) fruit mediated green synthesis of silver nanoparticles and its antioxidant activity: a comparison of thermal and ultra- sonication approach, *BioNanoSci.* 6 (2016) 15–21.
- [30] T.N.J. Immanuel Edison, R. Atchudan, M.G. Sethuraman, Y.R. Lee, Reductive-degradation of carcinogenic azo dyes using *ANACARDIUM OCCIDENTALE* testa derived silver nanoparticles, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 162 (2016) 604–610.