

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME DE RESIDENCIA PROFESIONAL
SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR UN HONGO
FILAMENTOSO.

ELABORADO POR
LAURA LIZETH VICTORIA RUIZ
INGENIERÍA BIOQUÍMICA
NÚM. DE CONTROL: 15270406

PERIODO
AGOSTO-DICIEMBRE 2019.

ASESORES:

Dra. Marlene Gómez Ramírez

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por brindarme la salud, la vida y darme la bendición de poder tener y disfrutar una familia la cual me apoyo en cada decisión durante esta etapa de mi vida. Gracias a mis padres Tere y Antonio, por sus enseñanzas y apoyo incondicional, los cuales fueron un pilar durante todo el transcurso de mi carrera, a mis hermanos Jairo y Karely, por confiar en mí y por haber estado presente en este largo recorrido, quienes fueron el motivo y la inspiración para lograr y cumplir este sueño. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

Al Instituto Tecnológico De Tuxtla Gutiérrez, por haberme aceptado ser parte de él y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que me acompañaron durante esta etapa, en general por todas las oportunidades que me ha brindado y por todos los conocimientos que me ha otorgado. A mis asesores, Dr. Miceli y Dra. Marlenne, por el apoyo, asesoría y paciencia en todo momento.

Por último, y no menos importante al CICATA Unidad Querétaro por el apoyo que me brindo durante el desarrollo del trabajo de fin de grado.

RESUMEN

Las nanopartículas (NPs) representan hoy en día un atractivo campo de investigación gracias a sus diversas aplicaciones dentro de las diferentes áreas. Actualmente se ha buscado implementar rutas de síntesis por métodos biológicos, donde su propósito es sustituir el uso de solventes químicos por un medio ecológico a partir de microorganismos.

En este proyecto de investigación se evaluó la biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de plata (AgNPs) a partir del filtrado extracelular de *Alternaria alternata*, el cual fue crecido en medio Czapek y generado por la biomasa fúngica previamente sometida a estrés por inanición de nutrientes.

La síntesis de AuNPs y AgNPs se realizó bajo dos condiciones, la primera se llevó a cabo bajo condiciones iniciales, a 45°C, 180 rpm y 72 horas, la segunda se realizó bajo condiciones de óptima actividad de la enzima nitrato reductasa dependiente y no dependiente de NADH, a 30°C, 150 rpm, durante 36 horas, en el caso del NADH este fue adicionado a una concentración final de 0.5 Mm. La producción de AuNPs y AgNPs se evidenció primeramente de manera visual por el cambio de coloración en el medio. Como indicador positivo se tomó la aparición de una coloración café y rosa lo que es presuntivo de la producción de AuNPs y AgNPs respectivamente. De igual forma se monitoreó el cambio de coloración en un espectrofotómetro UV-Visible en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm, esperando observar una banda de absorción a 420 y 540 nm indicando la presencia de AgNPs y AuNPs respectivamente, debido a la excitación de la superficie del plasmón. Se evidenció mayor producción de AuNPs bajo las condiciones iniciales, mientras que para AgNPs la mayor producción fue bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa con NADH.

El presente estudio muestra la capacidad del hongo *Alternaria alternata* de sintetizar nanopartículas de oro y plata, utilizando una tecnología de síntesis verde e innovadora

ÍNDICE

CAPITULO 1: GENERALIDADES DEL PROYECTO	7
1.1 INTRODUCCIÓN	7
1.2 Descripción de la empresa	8
1.3 Problemas a resolver	9
1.4 objetivos	10
1.5 Justificación	11
CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	12
2.1 Nanopartículas metálicas	12
2.1.2 Nanopartículas de Au	12
2.1.2 Nanopartículas de Ag	13
2.1.3 Nanopartículas de Fe	14
2.2 Métodos de Síntesis de nanopartículas	15
2.2.2 Método químico (Bottom- up)	16
2.2.3 Método físico (top- Down)	16
2.2.4 Métodos biológicos	17
2.2.4.1 síntesis de NPS por bacterias	17
2.2.4.2 síntesis de NPS por plantas	18
2.2.4.3 síntesis de NPS por vía fúngica	18
2.3 Actividad enzimatica.	19
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Material biológico.	22
3.2 Reactivación del cultivo	22
3.3 Cultivo del hongo filamentoso y producción de biomasa.	22
3.4 obtención de los filtrados extracelulares.	23
3.5 Síntesis de nanopartículas metálicas.	23
3.6 Caracterización de nanopartículas obtenidas.	24
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
4.1 Síntesis de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones iniciales	25
4.2 Síntesis de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones óptimas de la enzima nitrato reductasa	27
4.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)	27

4.2.2	Nanopartículas de plata (AgNPs).....	29
4.3	Comparación de la producción de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones distintas.....	32
CAPITULO 5: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.		34
5.1	Conclusión.....	34
5.2	Recomendaciones.....	34
FUENTES DE INFORMACIÓN.....		35

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. bio-Síntesis de nanopartículas metálicas bajo condiciones iniciales .	25
Figura 2. Espectros de absorción de AuNPs y AgNPs bajo condiciones iniciales	26
Figura 3. bio-síntesis de AuNPs, bajo condiciones de optima actividad de la enzima.	27
Figura 4. Espectros de absorción de AuNPs sintetizadas bajo condiciones de la enzima.	28
Figura 5. bio-síntesis de AgNPs, bajo condiciones de optima actividad de la enzima .	29
Figura 6. Espectros de absorción de AgNPs sintetizadas bajo condiciones de la enzima.	30
Figura 7. Espectros de absorción de AgNPs sintetizadas bajo condiciones de la enzima.	31
Figura 8. Espectros de absorción de AuNPs y AgNPs bajo diferentes condiciones.	33

CAPITULO 1: GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1 INTRODUCCIÓN

La nanotecnología incluye la producción, manipulación y el uso de materiales de un tamaño igual o menor a 100 nanómetros (nm) llamados nanopartículas (Astruc, 2004). En la actualidad existe una gran diversidad de nanopartículas con diferentes tamaños y su morfología puede ser amorfa, cristalina, esférica o triangular. Los nanomateriales pueden incluir nanopartículas orgánicas o inorgánicas. Una característica esencial de las nanopartículas es que, al tener tamaños tan pequeños, adquieren propiedades fisicoquímicas diferentes a las que presentan los metales de un tamaño superior, entre las características de estos materiales se encuentra la intensificación de las propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de diversos metales debido al aumento de su superficie de contacto (Wei et al., 2016).

Las nanopartículas son de gran interés científico y tecnológico, debido a la relación que existe entre sus propiedades ya sean físicas o químicas y su tamaño son lo que permiten que sean aplicadas en diferentes áreas tales como la medicina, óptica, biología, entre otras. Debido a los grandes avances, las nuevas necesidades y el gran número de nanomateriales utilizados en sectores industriales, en esta investigación, existe la necesidad de poder sintetizar dichas partículas de la forma más respetuosa con el medio ambiente. Es por ello que el presente trabajo está orientado a la síntesis de nanopartículas metálicas, obtenidas por un método biológico, el cual tiene ventajas sobre los métodos convencionales que implican agentes químicos asociados con la toxicidad medioambiental. Los métodos químicos son los más utilizados debido a la velocidad de síntesis y la alta pureza de las nanopartículas, sin embargo, estos métodos requieren de un gran gasto energético, generan químicos tóxicos y generalmente usan solventes no polares para obtener los coloides (Wei et al., 2016), mientras los métodos biológicos no requieren altas presiones ni altas temperaturas, lo que significa que no hay un gran gasto energético involucrado, además se ha demostrado que la biosíntesis de nanopartículas es viable económicamente y amigable con el medio ambiente.

En esta investigación, se realizará la biosíntesis de AuNPs y AgNPs utilizando el hongo filamentoso *A. alternata* con capacidad demostrada de sintetizar FeNPs, AuNPs y AgNPs (Alamilla-Martinez, 2019; Alamilla-Martinez et al., 2019), bajo dos condiciones de síntesis, observando diferencias en cuanto a intensidad de absorbancia bajo las condiciones ensayadas.

1.2 Descripción de la empresa

El Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA Querétaro), se ubica en la Ciudad de Querétaro en el Estado de Querétaro, México. Pertenece al Instituto Politécnico Nacional, es un centro de investigación científico y tecnológico, concebido para servir de enlace entre la comunidad científica y los sectores productivos de bienes y servicios, para atenderlos y ofrecerles soluciones a sus problemas de desarrollo. Para el cumplimiento de este objetivo, CICATA Querétaro desarrolla programas de investigación científica y tecnológica con un enfoque interdisciplinario y, de igual forma, atiende la formación de recursos humanos de alto nivel contribuyendo decisivamente al fortalecimiento de la calidad y la competitividad nacional e internacional del aparato productivo en México.

En relación al trabajo de investigación el CICATA, Querétaro ha realizado una gran cantidad de proyectos vinculados con apoyo económico del IPN, CONACYT y la Industria por lo que se han generado patentes, modelos de utilidad, prototipos y diversos desarrollos en sus 5 diferentes líneas de investigación, como son: Análisis de imágenes, Biotecnología, Mecatrónica, Energías alternativas, y Procesamiento de Materiales y Manufactura, las cuales están ligadas con la actividad económica de la región y del país.

El área de Biotecnología realiza una tarea de investigación y de formación de científicos a nivel de Posgrado, en los campos de biología molecular, bioquímica, biofísica, microbiología, química de alimentos y toxicología.

1.3 Problemas a resolver

La nanotecnología es un campo que está creciendo en estos últimos años debido a que las nanopartículas de algunos materiales ven incrementadas u optimizadas sus propiedades o aplicaciones en esa escala de tamaño. Al mismo tiempo, la problemática ambiental actual hace cada vez más necesario el desarrollo de procesos de química sostenible y la obtención de nuevos materiales mediante métodos de síntesis biológica.

Los métodos físico-químicos son los más utilizados debido a que generan grandes cantidades de nanopartículas en periodos de corto tiempo, sin embargo, requieren del uso de químicos peligrosos y reactivos altamente contaminantes en grandes cantidades, generando graves problemas al medio ambiente.

A diferencia de los métodos físicos y químicos, los métodos biológicos son ecológicamente amigables debido a su baja producción de residuos, no requieren altas presiones ni altas temperaturas, lo que significa que no hay un gran gasto energético involucrado. Además, se ha demostrado que la biosíntesis de nanopartículas es viable económicamente y que son procesos escalables a nivel industrial.

1.4 objetivos

General:

Evaluar la síntesis de nanopartículas de oro y plata, producidas por el filtrado extracelular de *Alternaria alternata*, bajo diferentes condiciones.

Específicos:

1. Obtención del filtrado extracelular de *Alternaria alternata* al ser crecida en medio Czapek.
2. Sintetizar nanopartículas de oro y plata bajo condiciones iniciales y condiciones de la enzima nitrato reductasa.
3. Caracterización de nanopartículas de oro y plata obtenidas.

1.5 Justificación

La generación de nuevas tecnologías y los avances en la ciencia, han fomentado la necesidad de investigar nuevos métodos para la obtención de materiales a nivel nanométrico que puedan aplicarse en las diferentes áreas de la ciencia y tecnología, que permitan de cierto modo contribuir a la solución de problemas que se enfrentan en la vida cotidiana.

Las nanopartículas pueden ser aplicadas en diversas áreas, pero su síntesis química involucra el uso de químicos tóxicos limitando las aplicaciones del producto y es costosa; Por lo que desarrollar formas de síntesis que sean limpias, no tóxicas y amigables con el medio ambiente es indispensable.

La síntesis por vía fúngica es amigable con el ambiente y propone mejorar el rendimiento y el control sobre las características finales del producto. Se ha investigado y reportado el uso de diferentes tipos de hongos para llevar a cabo la formación de nanopartículas metálicas, estos microorganismos poseen la capacidad para llevar a cabo la reducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas (Ashok et al.,2009). Las principales características en las que se fundamenta su aplicación son debidas a la secreción de una gran cantidad de enzimas (responsables de la reducción de los iones metálicos), facilidad de manejo, proceso económicamente viable y facilidad de realizar reacciones a escala mayor.

Este proyecto consiste en la producción de nanopartículas metálicas, por un hongo filamentoso. Lo anterior en base a que se ha descrito la capacidad de diversos hongos de secretar enzimas reductoras involucradas en la producción de nanopartículas.

CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Nanopartículas metálicas

En años recientes el uso de nanopartículas metálicas ha aumentado debido a las diversas aplicaciones en las que éstas pueden ser empleadas. Una nanopartícula metálica es un aglomerado de átomos del metal que tiene un tamaño entre 1 y 100 nm (Wei et al., 2016). Las nanopartículas pueden tener diferentes tamaños y su morfología puede ser amorfa, cristalina, esférica o triangular. Los nanomateriales pueden incluir nanopartículas orgánicas o inorgánicas. Una característica esencial de las nanopartículas es que al tener tamaños tan pequeños modifican las propiedades físicas, químicas y biológicas de las partículas, y a la vez modifican las reglas de la mecánica cuántica, las cuales determinan el comportamiento de la materia y la luz a nivel atómico y sub atómico, ocasionando que tengan propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas que difieren sustancialmente de partículas más grandes de un mismo elemento (Dowling et al., 2004), Es por eso que las nanopartículas tienen una diversidad de aplicaciones, las cuales dependen de su tamaño, forma y estabilidad (Salunke et al., 2016).

En el área médica, las nanopartículas se han utilizado en la administración de fármacos, en los cuales éstas funcionan como transportadores, que han podido ser dirigidos, y tienen la ventaja de poder desplazarse sin mayor dificultad a través de la sangre y tejidos para llegar finalmente a la célula blanco. Además, se ha visto que, debido a su pequeño tamaño, los transportadores de fármacos pueden atravesar la barrera hemato-encefálica, así como también las barreras epiteliales que, generalmente, impiden el suministro de fármacos en el sitio blanco deseado, y en consecuencia generan una acción inespecífica (Fadeel & Garcia, 2010). Dentro de las nanopartículas metálicas se encuentran las nanopartículas de oro (AuNPs), nanopartículas de plata (AgNPs) y nanopartículas de hierro (FeNPs).

2.1.2 Nanopartículas de Au

Las nanopartículas de oro se han empleado ampliamente en bio-nanotecnología en función de sus propiedades únicas y múltiples funcionalidades de superficie. La facilidad de funcionalización de AuNPs proporciona una plataforma versátil para ensamblajes nanobiológicos con oligonucleótidos, anticuerpos, y proteínas. Las AuNPs presentan una gran actividad química en especial en las reacciones de oxidación y podrían utilizarse como catalizadores para eliminar contaminantes orgánicos, difíciles de degradar, útiles en la descontaminación de las aguas residuales.

El interés de las AuNPs se centra en la alta biodisponibilidad de su superficie, lo cual facilita su funcionalización con moléculas, enzimas y sistemas biológicos. Sus potenciales aplicaciones son como agentes antimicrobianos, catalizadores y por su habilidad de apagar y encender a fluoróforos, pueden ser empleadas como biomarcadores de diversas moléculas tales como anticuerpos, enzimas, DNA e incluso células bacterianas o cancerígenas, además son una opción para el transporte de activos terapéuticos, esto debido a su fácil funcionalización y transporte a través de las células, y por su baja citotoxicidad son excelentes para estas aplicaciones (Yeh et al., 2012).

2.1.2 Nanopartículas de Ag

Las nanopartículas de plata poseen propiedades particulares que les atribuyen aplicaciones muy promisorias y novedosas en diversos campos de la ciencia, tales como el desarrollo de biosensores, el diagnóstico y tratamiento de cáncer, la liberación controlada de fármacos, y el potencial antimicrobiano (Sripriya et al., 2013). Se han realizado estudios como agentes antifúngicos, antivirales y antimicrobianos, obteniendo resultados muy favorecedores, se propone su uso haciendo frente al problema de las bacterias multirresistentes a antibióticos ya que se ha visto que las AgNPs no generan resistencia pues su mecanismo de acción tiene varios puntos diana, actúan a nivel de pared celular específicamente en el enlace β 1-4 del peptidoglucano ocasionando que la pared se vuelva más laxa, inhibición de enzimas entre ellas la ATP sintetasa encargada de la síntesis de ATP al final de la cadena transportadora de electrones en la membrana celular, así como daño a la cadena transportadora de electrones y por consiguiente un daño celular por estrés oxidativo, y por último ocasionan daño directo al material genético teniendo como blanco los grupos fosfato del DNA (Kon & Rai, 2013)

Actualmente la aplicación de las nanopartículas de plata se encuentra enfocada en su uso como agentes bactericidas o fungicidas en áreas tales como: la biotecnología, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, tratamiento del agua y productos de consumo a base de plata (Khaydarov et al., 2009).

2.1.3 Nanopartículas de Fe

Las nanopartículas de hierro poseen la capacidad catalítica, al igual que la mayoría de los nanomateriales, esta característica les es conferida e intensificada debido a la mayor área superficial de contacto que tienen por su tamaño tan pequeño, además de la naturaleza del propio material puesto que es muy reactivo, lo cual facilita un intercambio de electrones para lograr la estabilidad, esta propiedad ha llamado la atención en el área ambiental pues se ha observado que las nanopartículas pueden ser muy útiles para la remoción, y transformación de diferentes contaminantes ya sean de naturaleza orgánica o inorgánica, se ha visto su acción en la desclorificación de solventes orgánicos, en la transformación de nitratos de los fertilizantes, en la destoxicación de pesticidas y la inmovilización de algunos metales pesados como Cr, Hg y As en el suelo (Bhalerao, 2014); Además de que pueden ser usadas tanto en sistemas acuosos como en sólidos.

Las FeNPs se caracterizan por su capacidad magnética, por su tamaño (10-20 nm) puede exhibir esta característica única denominada ultra magnetismo, que las hace excelentes candidatas para su aplicación como biomarcadores y para obtención de imágenes en resonancia magnética (Huber, 2005).

2.2 Métodos de Síntesis de nanopartículas

Existen diversos métodos físicos, químicos y biológicos, para la obtención de nanopartículas.

Tabla 1 muestra un comparativo entre los métodos Físico-Químicos y biológicos.

Tabla 1. Comparativa de las características de los métodos de síntesis de nanopartículas Físico-Químicos y Biológicos. (Sandoval-Cardenas, 2017)

Métodos Físico-Químicos	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Alta velocidad de síntesis (min-horas). - Alta pureza de las nanopartículas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Usan y/o generan químicos tóxicos. - Baja especificidad de transformación. - Baja eficiencia de producción (alrededor del 60%) - Requieren materia prima de alta pureza. - Generalmente usan solventes no polares para obtener los coloides. - Aquellas inmersas en solventes no polares no pueden usarse para aplicaciones biomédicas. - Son poco estables en solución acuosa.
Métodos Biológicos	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Uso de menor cantidad de químicos tóxicos. - Existencia de gran diversidad microbiana con amplia gama de mecanismos de biosíntesis. - La alta especificidad enzimática a sustratos permite la producción selectiva de un solo tipo de NP. - Las NP sintetizadas están recubiertas por una molécula orgánica que las hacen más estables en solución acuosa. - Potencial aplicación biomédica debido a sus recubrimientos biocompatibles. - Potencial uso de residuos como materia prima. - El recubrimiento biológico modifica en forma específica el tipo de cristal formado por la nanopartícula. - Poseen mayor actividad catalítica, mayor área de superficie específica y mejoran el contacto entre la enzima y la sal metálica. - Produce desechos biológicos que son biodegradables. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempos de síntesis prolongados (días-semanas) - Se desconocen algunos de los parámetros para la síntesis controlada. - Es necesario mejorar los métodos de procesamiento - Algunos microorganismos producen diámetros variados. - Bajo porcentaje de transformación.

Los métodos físico-químicos son los más utilizados; sin embargo, poseen tres principales problemas: la inestabilidad de las nanopartículas formadas (Wang & Herron, 1991), los recubrimientos hidrófobos con los que se producen y el uso de químicos tóxicos que limitan sus aplicaciones biomédicas en el campo clínico (Joo et al., 2003). Estos métodos generan grandes cantidades de nanopartículas, sin embargo, son métodos que requieren de un gran gasto energético y, además, requieren, generalmente, del uso de químicos peligrosos y de reactivos altamente contaminantes en grandes cantidades (Wei et al., 2016). A continuación, se mencionan los métodos de síntesis.

2.2.2 Método químico (Bottom- up)

Estos métodos se basan en la reducción de metales o átomos metálicos mediante un proceso químico. El método convencional más empleado para la síntesis de nanopartículas metálicas es la reacción de una sal o complejo del metal en disolución con un fuerte reductor como el borohidruro sódico (NaBH_4) en presencia de algún agente estabilizante o dispersante (polímero, coloide, surfactante o agente complejante) para evitar la agregación y formación del metal por aglomeración. Este proceso presenta varias desventajas, como la alta toxicidad del borohidruro o la generación de gases inflamables de hidrógeno como subproducto (Tahrioui, 2016).

2.2.3 Método físico (top- Down)

Estos métodos consisten en remover ciertas partes de un sustrato en dimensiones macroscópicas hasta obtener la nanopartícula de tal forma que las nanoestructuras formadas son del mismo material que el material sustrato. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados (Wachs, 2001).

Los métodos más representativos son: a) La evaporación térmica, que consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada. b) Depósito químico en fase vapor, consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas. (Schmid, 2004).

2.2.4 Métodos biológicos

Para la obtención de nanocompuestos se han implementado diversas tecnologías que reduzcan los costos, aumente la productividad y funcionalización, es por ello que la biosíntesis se desarrolla como una alternativa para la producción de nanomateriales como una herramienta verde para la síntesis, en donde se implementan sistemas biológicos y organismos vivos para el desarrollo, modificación o producción de productos que puedan generar un bien o un servicio (Botello & Garza, 2007); estos métodos se centran en el estudio y uso de la actividad metabólica de algunas microorganismos tales como bacterias, levaduras y hongos, los cuales pueden producir diferentes tipos de NPs, estos microorganismos mediante su actividad metabólica generan una amplia variedad de metabolitos que favorecen la reducción de iones del medio; este proceso se lleva a cabo en condiciones de temperatura y presión ambiental (Yañez & Ibañez, 2016).

Las nanopartículas sintetizadas por métodos biológicos están estabilizadas por una capa de naturaleza biológica principalmente proteica cargadas parcialmente y que evitan la aglomeración de éstas debido a que son repelidas electrostáticamente por lo que presentan una mayor estabilidad, además les permite comunicarse con biomoléculas en la superficie y al interior de las células de manera que puede decodificar y designar a diversas propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las células, por lo que esta característica brinda un gran potencial a las nanopartículas para ser aplicadas en el área de la medicina (Oza & Ambernath, 2012).

2.2.4.1 síntesis de NPS por bacterias

Las bacterias son los microorganismos más estudiados para la síntesis de diversos nanocompuestos, siendo estos microorganismos considerados como potenciales productores de NPs de diferentes tipos como: Oro, Zinc, Plata, Cobre, Silicio, Entre otros (Correa et al., 2016), debido a su capacidad de reducir iones de metales, además de esto, son procesos amigables con el medio ambiente ya que no requieren de químicos altamente tóxicos y peligrosos.

2.2.4.2 síntesis de NPS por plantas

Actualmente es posible incluir el uso de compuestos de origen biológico, como reductores y estabilizadores para la síntesis de nanoestructuras. La síntesis por plantas se realiza principalmente con el extracto de la planta en donde se encuentran metabolitos secundarios que tienen propiedades reductoras, entre estos se encuentran los compuestos fenólicos como el ácido gálico, ácido benzoico y ácido cafeico entre otros, que están presentes en algunas plantas conocidas por sus propiedades antioxidantes (Almajano et al., 2008). Así por ejemplo se han obtenido nanopartículas de oro y plata a temperatura ambiente utilizando ácido gálico, un metabolito presente en algunos vegetales (Yossaf & Thomas, 2007).

2.2.4.3 síntesis de NPS por vía fúngica

Se ha investigado y reportado el uso de diferentes tipos de hongos para llevar a cabo la formación de nanopartículas metálicas. Mediante estos estudios se ha demostrado que estos microorganismos poseen la capacidad para llevar a cabo la reducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas (Ashok & Varma, 2009). Las principales características en las que se fundamenta su aplicación son debidas a la secreción de una gran cantidad de enzimas (responsables de la reducción de los iones metálicos), facilidad de manejo, proceso económicamente viable y facilidad de realizar reacciones a escala mayor.

La producción de nanopartículas con hongos tiene diversas ventajas. La primera consiste en que la red del micelio soporta mayores presiones de flujo, agitación y otras condiciones en biorreactores u otras cámaras de cultivo a comparación de plantas y bacterias. Los hongos demandan ambientes específicos debido a sus complejos requerimientos nutricionales, pero tienen un manejo sencillo que los hace de fácil fabricación. Finalmente, los hongos secretan gran cantidad de proteínas reductoras, lo que permite obtener las nanopartículas en forma extracelular, eliminando procesos de purificación de las nanopartículas, al evitar realizar lisis celular (Narayanan & Sakthivel, 2010).

2.3 Actividad enzimática.

Las enzimas se utilizan ampliamente como biocatalizadores en numerosas industrias como la industria alimentaria, química, farmacéutica y de fermentación. Estos biocatalizadores son conocidos por su especificidad selectiva de sustrato y actividad catalítica mayor en comparación con catalizadores químicos (Kulkarni et al., 2015). Ciertos hongos tienen la capacidad de producir metabolitos extracelulares que les sirven para su propia supervivencia cuando se exponen a tensiones ambientales como depredadores, variaciones de temperatura, escasez de nutrientes y materiales tóxicos (tales como iones metálicos), por mencionar algunos. En el último caso, uno de los mecanismos implicados en la detoxificación de metales involucra la intervención de enzimas extracelulares como son las reductasas, reduciendo el metal y disminuyendo su toxicidad. Estudios han demostrado que el NADH podría ser un factor clave para la reducción de iones metálicos. Sin embargo, el NADH por sí solo no es suficiente para que se produzca la reacción, se ha informado que las enzimas como hidrogenasas y compuestos fenólicos como, naftoquinonas y antraquinonas con excelentes propiedades redox podrían actuar como lanzadera de electrones en la reducción de metales y la producción de nanopartículas (Hulkoti & Taranath, 2014).

En los organismos, el NADH es una coenzima reducida implicada en algunas reacciones redox, y se puede utilizar como agente reductor por muchas enzimas *in vivo*. En el proceso, el NADH actúa como un transportador de electrones y de los iones metálicos, obteniendo electrones de NADH a través de la reductasa dependiente de NADH, y luego se reduce el metal (Li et al., 2012). Diversos estudios han reportado la formación de nanomateriales metálicos o semimetálicos, por ejemplo, MoS_2 utilizando hongos. Mediante el uso de *F. oxysporum* se ha llevado a cabo la síntesis de diferentes nanomateriales metálicos, relacionándolo con la actividad de enzimas reductasas dependientes de NADH. También se ha realizado la producción de nanopartículas de plata por acción de nitrato reductasa dependiente de α -NADPH purificada. Se ha reportado un mecanismo para reducir biológicamente H_2PtCl_6 y $PtCl_2$ a nanomateriales de platino por medio de la enzima hidrogenasa de *F. oxysporum*, dicha enzima pertenece al grupo de las oxidoreductasas (Mohamed et al., 2015).

La enzima más reportada en síntesis fúngica de nanopartículas es la nitrato reductasa dependiente de NADH, esta es una enzima constitutiva que forma parte del ciclo del nitrógeno y ayuda en la bio-reducción de iones metálicos, no obstante, se han encontrado reportes que describen una inducción de la enzima al poner en contacto al microorganismo con el sustrato. Se le ha relacionado con la formación de AgNPs, AuNPs y en la reducción del ion férrico, su actividad es clave en la reducción mas no es la única molécula que actúa, se ha señalado que es una reacción en conjunto. Esto se ve afectado por las condiciones ambientales, principalmente pH, temperatura y velocidad de agitación, además de la concentración tanto del sustrato como la cantidad de enzima disponible (Hulkoti & Taranath, 2014). Otras actividades enzimáticas reportadas en la síntesis de nanopartículas de sulfuro de zinc, son la sulfato y sulfito reductasa que participan en la asimilación del sulfato en *Rhodobacter sphaeroides* para reducir el sulfato a sulfuro y posteriormente se forme cisteína reaccionando con O-acetil serina, para finalmente formar el S^{+2} por acción de la cistein desulfidrasa en presencia del zinc, para posteriormente formar ZnS NPs (Ramezani, 2010).

2.4 Factores que afectan la producción de nanopartículas metálicas

La síntesis biológica de nanopartículas se ve afectada por diversos factores tanto biológicos como físico-químicos. Las enzimas llevan a cabo la reducción de los iones para la formación de las NPs, este proceso se ve afectado por la concentración del sustrato enzimático, la temperatura de síntesis, el pH, el medio de cultivo, el tipo de microorganismo, etc.; mientras que la estructura final de las NP es alterada por la presencia de proteínas y péptidos quelantes que se adhieren a la superficie de esta e impiden que sea modificada. El conocimiento de los mecanismos involucrados en la producción de las NP, como identificación de los genes específicos y caracterización de las enzimas involucradas, es un factor vital para controlar sus características finales. Es posible que algunos de los mecanismos involucrados en la resistencia y tolerancia a metales estén involucrados en la síntesis de NPs, como pueden ser: sistemas de flujo de salida, reacciones redox, bio-absorción, bio-acumulación, acomplejación extracelular y precipitación (Beveridge, 1989), sin embargo, muchos mecanismos de síntesis biológica de las NPs se desconocen aún.

2.5 *Alternaria alternata*

El hongo *Alternaria alternata* perteneciente al género *Alternaria* se ha reportado como patógeno vegetal, saprofito y endófito, capaz de crecer en un amplio rango de temperatura (2-33 °C) y pH (2-8), se ha aislado de cultivos de tomate, fresa, así como en el suelo y en materia orgánica en descomposición, es productor de micotoxinas, Altenueno, Tentoxina, AF toxina, AS toxina, sin embargo, su producción depende de las condiciones ambientales de crecimiento del hongo (Lou et al., 2013). De igual manera este microorganismo puede causar infecciones subcutáneas y/o micosis en personas inmunocomprometidas. Existen reportes sobre la producción de diversas micotoxinas en diferentes sustratos y a diferentes temperaturas, pero siempre con una actividad de agua (A_w) superior a 0.90 (Pavón et al., 2012).

Este hongo también ha sido estudiado como productor de nanopartículas metálicas, específicamente de AgNPs, empleando $AgNO_3$ y el filtrado extracelular del hongo cultivado en los medios caldo papa dextrosa, caldo extracto de malta, sacarosa y Czapek; las nanopartículas se biosintetizaron a 45°C, siendo de forma esférica y de tamaño 2-50 nm (Alamilla-Martínez, 2017) así como empleando la biomasa y filtrado extracelular (FE) provenientes del medio de caldo papa dextrosa obteniendo AgNPs esféricas, polidispersas de 2-60 nm a 25 °C, observando una mayor producción de nanopartículas al emplear el filtrado extracelular que con la biomasa fúngica (Gajbhiye et al., 2009) y AuNPs sintetizadas empleando una sal de $HAuCl_4$ 3mM y el filtrado extracelular del hongo cultivado en medio caldo papa dextrosa durante 12 días, la mezcla del filtrado y la sal se incubó durante 24 h a temperatura ambiente, obteniendo partículas esféricas, triangulares y hexagonales de diversos tamaños (2-30 nm) (Sarkar et al., 2012), además de FeNPs con forma cubica y tamaño de 9 ± 3 nm, incubando la biomasa del hongo y $Fe(NO_3)_3$ a 1 mM, durante 72, 180 rpm y 45°C (Mohamed et al., 2015; Alamilla-Martinez et al., 2019).

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico.

Se utilizó la cepa fúngica *Alternaria alternata* codificado como MVSS-AH-5, perteneciente al acervo microbiológico del Laboratorio de Microbiología Ambiental del CICATA Querétaro, IPN. Aislado anteriormente de la mina “La Valenciana” del estado de Guanajuato, en México (Rojas-Avelizapa et al., 2017; Alamilla-Martinez, 2019)

3.2 Reactivación del cultivo.

Se emplearon cuatro medios líquidos y un medio en placa para la reactivación del cultivo de *A. alternata* a partir de esporas conservadas en glicerol a -20 °C, para tal fin se prepararon cuatro matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de los medios: Czapek, Caldo papa dextrosa (CPD), Sacarosa, Caldo malta dextrosa (CMD). Una vez preparados los matraces se inocularon con 100 microlitros de la suspensión de esporas y fueron incubados por 5 días a 30°C y 150 rpm, hasta la observación de crecimiento. De igual forma se tomó una asada de la suspensión de esporas y esta fue sembrada en placas de agar PDA e incubadas a 30° C hasta la observación de crecimiento.

3.3 Cultivo del hongo filamentoso y producción de biomasa.

Una vez reactivado el cultivo de *Alternaria alternata* MVSS-AH-5 este fue sembrado en placas con agar PDA a 30 °C hasta esporulación, posteriormente las esporas se colectaron con agua destilada estéril y raspado, se colocaron en un tubo Falcón estéril de 50 mL, debido a la morfología colonial del hongo se realizó una agitación mecánica en vortex y se utilizaron perlas de vidrio para liberar los conidios del micelio, y fragmentar el micelio. Se determinó la concentración de conidios/micelio en la solución realizando el conteo en una cámara Neubauer en un microscopio de campo luminoso. Una vez conocido el número de conidios, se inocularon en matraces de 1 L conteniendo 250 mL de medio Czapek a una densidad poblacional final de 3.3×10^5 conidios/mL. Los matraces inoculados se incubaron por 5 días a 30°C y 150 rpm para obtener la biomasa fúngica (Sandoval-Cárdenas, 2017; Alamilla-Martínez et al., 2018; Alamilla-Martínez et al., 2019).

3.4 obtención de los filtrados extracelulares.

Al Finalizar el periodo de incubación en medio líquido, se separó el micelio del medio de cultivo por filtración al vacío con papel filtro estéril. La biomasa retenida en el filtro se lavó tres veces con agua destilada estéril, se determinó el peso húmedo de la biomasa obtenida, posteriormente se depositó 5 g de biomasa en matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 50 ml de agua destilada estéril, y fue incubada durante 72 horas a 30°C con una agitación de 150 rpm para la obtención del filtrado extracelular (FE) donde se encuentran inmersas todas las biomoléculas que fueron excretadas por el hongo al estar en estado de inanición, algunas de estas están implicadas en el proceso de síntesis de nanopartículas metálicas.

El filtrado se recuperó por doble filtración al vacío, previamente las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm, para la primera filtración se utilizó papel filtro de poro fino, y para la segunda se empleó una unidad de filtración con unidad de membrana 0.22 um. El filtrado extracelular se almaceno en refrigeración a 4°C hasta su uso (Alamilla-Martinez, 2019; Alamilla-Martínez et al., 2019).

3.5 Síntesis de nanopartículas metálicas.

Para la síntesis de nanopartículas, se realizó con base en el realizado por (Alamilla-Martinez, 2019) con algunas modificaciones, se llevó a cabo la producción de nanopartículas de oro y plata bajo dos condiciones.

Condición 1: Se preparó una mezcla en matraces de 125 mL, que consistió en 22.5 mL de filtrado extracelular y 2.5 mL de las siguientes soluciones: $AgNO_3$, $AuHCl_4$ a 10 mM para dar una concentración final de 1mM. Los matraces se incubaron en la oscuridad a 72 h, 45°C y 180 rpm. Se preparó dos controles negativos: control de las sales metálicas y control de filtrado extracelular, el primero consistió en la solución de la sal metálica en agua destilada y el segundo el filtrado extracelular sin la sal metálica. Al finalizar el tiempo de incubación se observó el cambio de coloración del medio (Alamilla-Martinez, 2019; Alamilla-Martínez et al., 2019).

Condición 2: Se evaluó la síntesis de NPs bajo condiciones óptimas de la enzima nitrato reductasa dependiente y no dependiente de NADH las cuales son 36 h, 30° y 150 rpm (Alamilla-Martínez, 2019). Se utilizaron matraces de 125 mL, conteniendo una mezcla que consistió en 9 mL de filtrado extracelular, 1 mL de $AuHCl_4$, $AgNO_3$ a 10 mM para dar una concentración final de 1mM, bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa no dependiente de NADH. Para la producción de NPs bajo la enzima dependiente de NADH se adiciono 0.5 mL de NADH a 10 mM para dar una concentración final 0.5 Mm de NADH. Todos los matraces se incubaron en

oscuridad a las condiciones óptimas para la enzima (36 h, 30°C, 1mM sustrato y 150 rpm) (Alamilla-Martinez, 2019). De igual forma se incluyeron controles negativos como se mencionó en el caso 1.

3.6 Caracterización de nanopartículas obtenidas.

La producción de NPs al final del tiempo de incubación se evidenció de manera visual por el cambio de coloración en el medio (filtrado extracelular y la sal metálica), como indicador positivo se tomó la aparición de una coloración café y rosa para las AgNPs y AuNPs respectivamente, midiendo este cambio en un espectrofotómetro UV-Visible en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm, esperando observar una banda de absorción a 420 y 540 nm indicando la presencia de AgNPs y AuNPs respectivamente (Jain et al., 2011; Sarkar et al., 2012), debido a la excitación de la superficie del plasmón (Alamilla-Martinez, 2019).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES.

La síntesis de nanopartículas de oro y plata (AuNPs y AgNPs) se realizó bajo dos condiciones: condiciones iniciales (1 mM sustrato, 45 °C, 180 rpm, 72 h) y condiciones de óptima actividad de la enzima nitrato reductasa dependiente y no dependiente de NADH (1 mM sustrato, 30°C, 36 h, 150 rpm) y 0.5 mM de NADH solo para la enzima dependiente de NADH, todos los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo controles negativos. En todos los casos se empleó el filtrado extracelular obtenido a partir de la biomasa del hongo *Alternaria alternata* MVSS-AH-5 cultivada en medio Czapek. Los resultados se muestran a continuación.

4.1 Síntesis de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones iniciales.

El primer experimento consistió en evaluar la síntesis de AuNPs y AgNPs bajo condiciones iniciales, 72 h, 45°C y 180 rpm. Se evidenció la síntesis NPs de manera visual por la aparición de una coloración purpura y café-marrón en el medio para las AuNPs y AgNPs respectivamente, en la figura 1 A y B, puede observarse dicha coloración, la cual se debe a la excitación de las vibraciones de plasmón superficiales en las nanopartículas (Henglein, 1993).

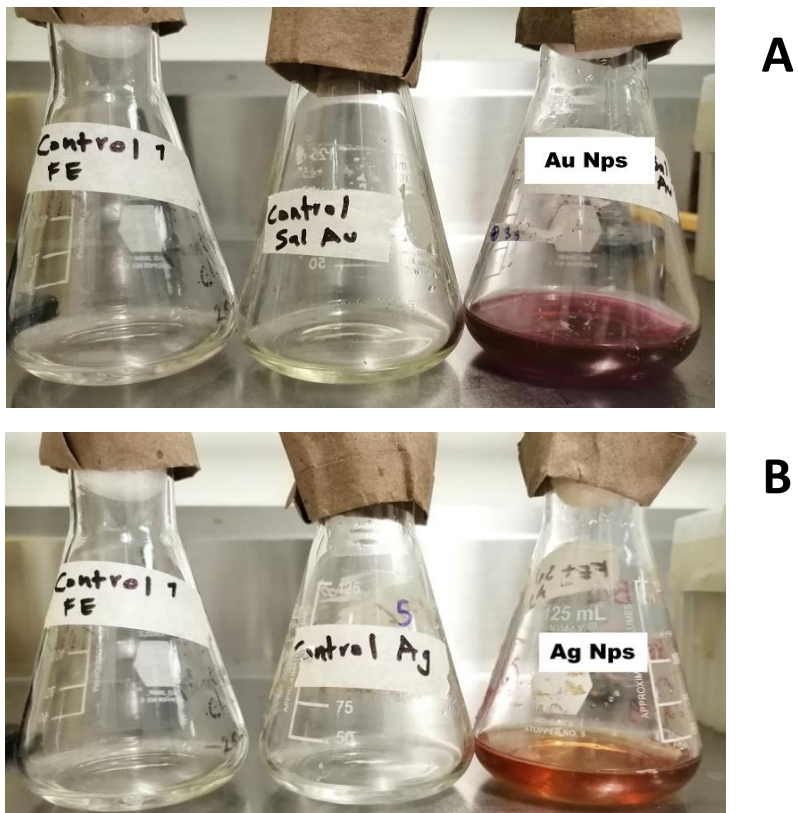
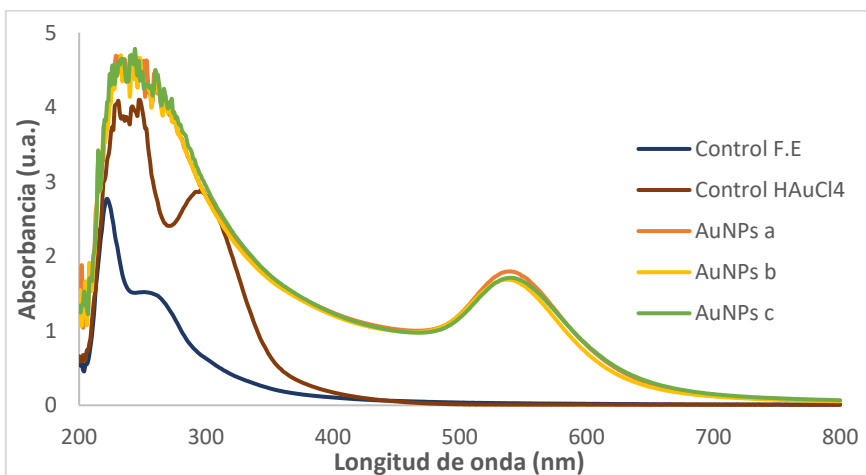


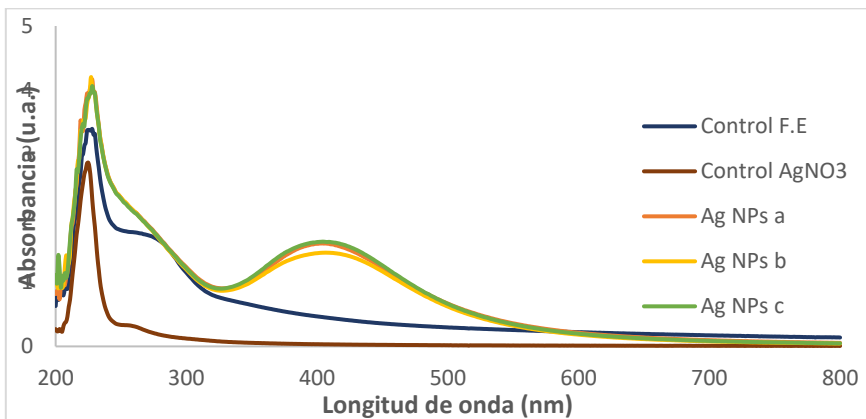
Figura 1. Síntesis de nanopartículas metálicas bajo condiciones iniciales (1 mM sustrato, 45°C, 72 h y 180 rpm.)
A) nanopartículas de oro (AuNPs) y B) nanopartículas de plata (AgNPs).

Para confirmar la producción de AuNPs y AgNPs, las muestras fueron analizadas en un espectro UV-Vis. La figura 2 A y B muestra los espectros de absorción por triplicado de las de AuNPs y AgNPs producidas bajo condiciones iniciales. En la Figura 2 A, se aprecia claramente una banda de absorción alrededor de los 550 nm indicando la presencia de AuNPs, esta banda de absorción surge de la oscilación colectiva de los electrones de conducción debido a la excitación resonante por los fotones incidentes, que se denomina banda de plasmón superficial (Jain et al., 2006). En la Figura 2 B, se observa una banda de absorción alrededor de los 420 nm indicando la presencia de AgNPs.

En ambos gráficos, se observa una banda entre los 250 y 300 nm, de los controles negativos, se atribuye a aminoácidos aromáticos de las proteínas presentes en el filtrado extracelular, se sabe que la banda de absorción a aprox. 270 nm surge debido a excitaciones electrónicas del triptófano y tirosina de los residuos en las proteínas (Deendayal et al., 2003). En los controles negativos de la sal metálica, se observa una banda de absorción alrededor de los 320 nm (Figura 2 A), indicando la presencia de iones de Au.



A



B

Figura 2. Espectros de absorción de nanopartículas de oro (A) y plata (B) sintetizadas bajo condiciones iniciales (45°C, 72 h, 180 rpm), a partir del FE de *Alternaria alternata*.

4.2 Síntesis de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones óptimas de la enzima nitrato reductasa.

El segundo experimento consistió en evaluar la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) y nanopartículas de plata (AgNPs) bajo las condiciones óptimas de la enzima nitrato reductasa, empleando las condiciones reportadas por (Alamilla-Martinez, 2019), los estudios de optimización para ambas enzimas, realizados en el filtrado extracelular proveniente del medio Czapek mostraron que las condiciones de mayor actividad enzimática fueron a 30°C, 150 rpm, concentración de sustrato 1 mM y 36 h de reacción. Para la enzima nitrato reductasa dependiente de NADH, este cofactor fue adicionado a una concentración final de 0.5 Mm.

4.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)

La síntesis de nanopartículas de oro se evidenció inicialmente por el cambio de coloración en el medio, se reveló un color purpura el cual se presentó al finalizar el periodo de incubación, en la Fig. 3 se puede observar la diferencia entre los dos ensayos, donde la muestra A (con NADH) presenta una coloración más intensa en comparación a la muestra B (Sin NADH), se ha demostrado que el NADH actúa como un transportador de electrones y de los iones metálicos, obteniendo electrones de NADH a través de la reductasa dependiente de NADH, la cual se asocia con la reducción del ion metálico (Li et al., 2012)

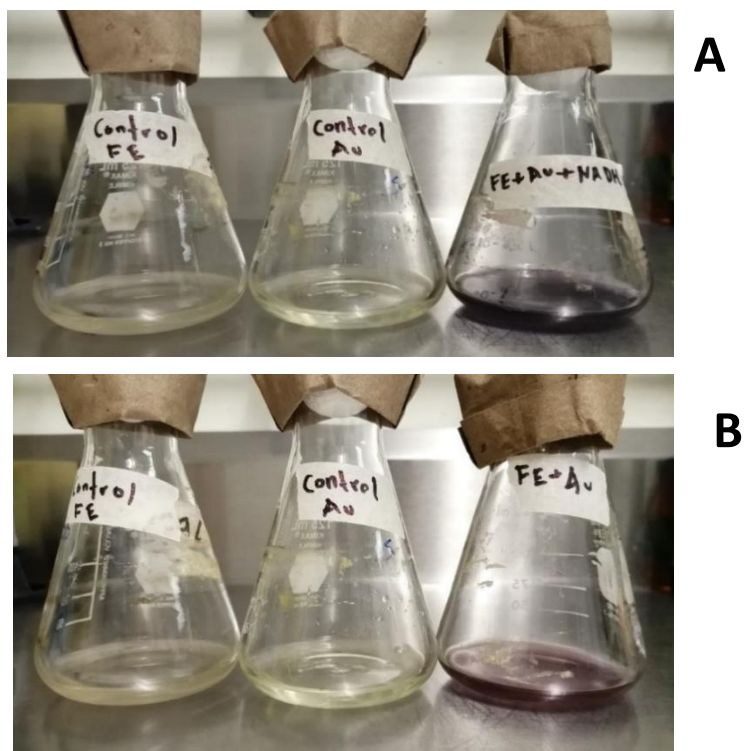


Figura 3. Bio-síntesis de nanopartículas de plata, bajo condiciones de óptima actividad de la enzima nitrato reductasa (30°C, 36 h, 1 Mm sustrato) y 150 rpm en la oscuridad. (A) con NADH (B) sin NADH.

Para confirmar la producción de AuNPs las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis, haciendo un barrido de 200 a 800 nm, mostrando una banda de absorción alrededor de 550 nm, indicando la presencia de AuNPs, en comparación con el control negativo que no mostró esa banda de absorción, este fenómeno se atribuye al plasmón de resonancia superficial (Vigneshwaran et al., 2010). La figura 4 A y B corresponde a los espectros de absorción por triplicado de las AuNPs producidas, con dos FE obtenidos del mismo hongo. La figura 4 A muestra las AuNPs, sintetizadas con la adición de NADH y la figura 4 B sin la adición de NADH respectivamente, donde se observa claramente la diferencia de absorción entre los dos ensayos. Cuando el NADH no se adiciona se observa una banda a los 550 nm con una elevación menor en comparación a la muestra que contiene NADH, la cual muestra bandas con mayor intensidad en esa misma zona, se conoce que la intensidad de la banda está relacionada con la concentración de nanopartículas (Vigneshwaran et al., 2010), por lo que se podría inferir que en presencia de NADH existe una mayor concentración que cuando este no se adiciona, sería deseable poder realizar imágenes TEM para comparar diferencias en morfología y tamaño en caso de que se hubieran presentados cambios.

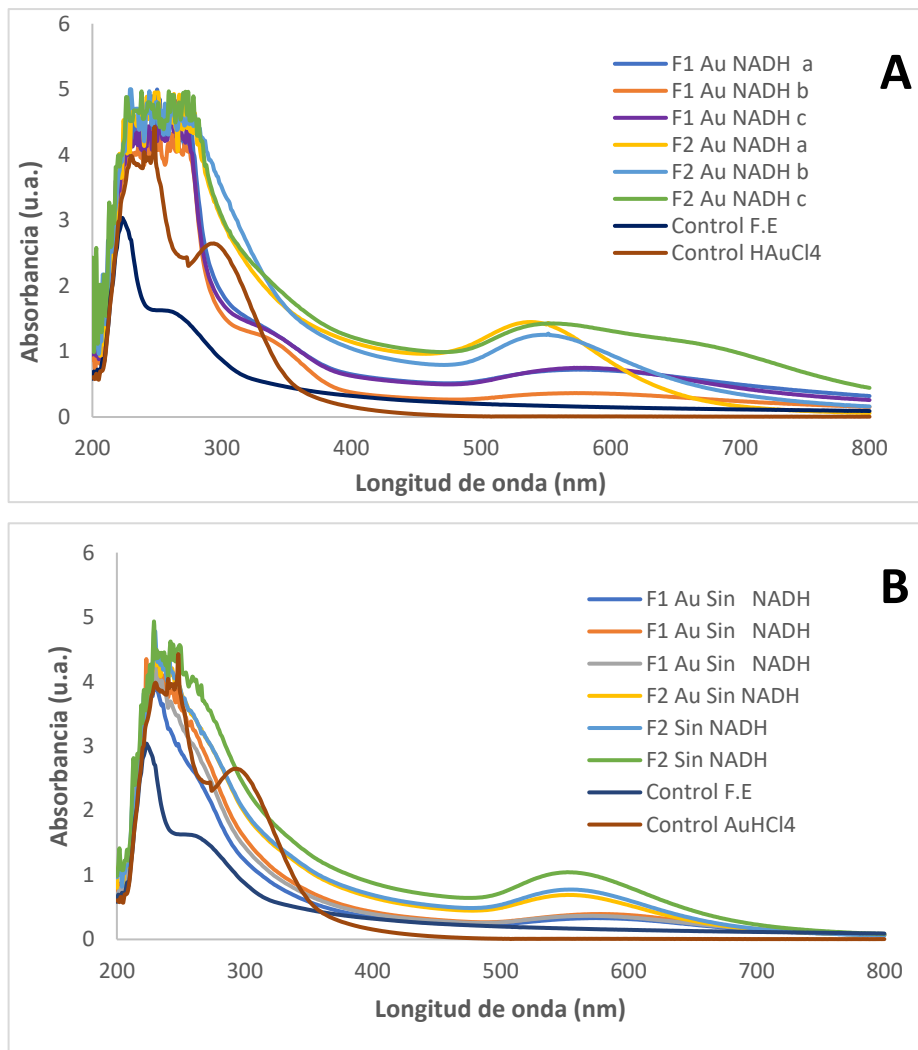


Figura 4. Espectros de absorción de nanopartículas de oro sintetizadas bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa (30°C, 36 h, 150 rpm), adicionados con NADH (A) y Sin NADH (B).

4.2.2 Nanopartículas de plata (AgNPs)

La detección de AgNPs se llevó a cabo inicialmente por el cambio de coloración en el medio, el cual se produce por el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales (Herrera et al., 2012). El plasmón se produce por el fenómeno vibratorio típico de los plasmas, creado por la interacción de la radiación electromagnética de baja frecuencia y los portadores de carga libres, oscilando en resonancia con esta (Hinojosa et al., 2001).

El cambio de coloración se ilustra en la Fig. 5, donde claramente se observa la diferencia entre las dos muestras, de igual manera como en la síntesis de AuNPs, en presencia del NADH se observa una mayor intensidad en la coloración café, en comparación cuando este no fue adicionado. Posiblemente este suceso se debe a que la enzima nitrato reductasa dependiente de NADH se asocia con la reducción de Ag^+ a Ag^0 (Durán et al., 2005).



A



B

Figura 5. Bio-síntesis de nanopartículas de plata, bajo condiciones de optima actividad de la enzima nitrato reductasa (30°C, 36 h, 1 Mm sustrato) y 150 rpm en la oscuridad. (A) con NADH (B) sin NADH.

Las nanopartículas de plata también se caracterizaron por espectroscopía de UV-Vis, realizando un barrido de 200-800 nm, en la figura 6 y 7 se observa que el número de bandas y la intensidad de absorción en la región que comprende alrededor de los 420 nm es alto en comparación con la intensidad de los controles negativos, estas bandas indican la formación de AgNPs (Mahdavi et al., 2013). La Figura 6, resulta tener un pico de absorción más alto en comparación a la Figura 7, la cual corresponde a las AgNPs formadas con NADH para el primer caso, incluso fue necesario realizar una dilución 1:2 (Figura 6 B) para poder evidenciar el pico el cual además de ser más elevado es más estrecho, lo que nos indicaría posiblemente que las AgNPs sintetizadas con la adición de NADH presentan un tamaño más homogéneo, (Daniel & Astruc, 2004) Menciona que la intensidad de la banda del plasmón superficial se ve reducida, ya que es visible solamente cuando están presentes nanopartículas de tamaño más pequeño, sin embargo es necesario realizar micrografías TEM para corroborar lo antes mencionado.

(Hulkoti & Taranath, 2014), han demostrado que el NADH podría ser un factor clave para la reducción de iones metálicos. Sin embargo, el NADH por sí solo no es suficiente para que se produzca la reacción, y otras sustancias activas con peso molecular más alto también podrían jugar un papel importante en la reducción de los iones metálicos tales como las oxidoreductasas.

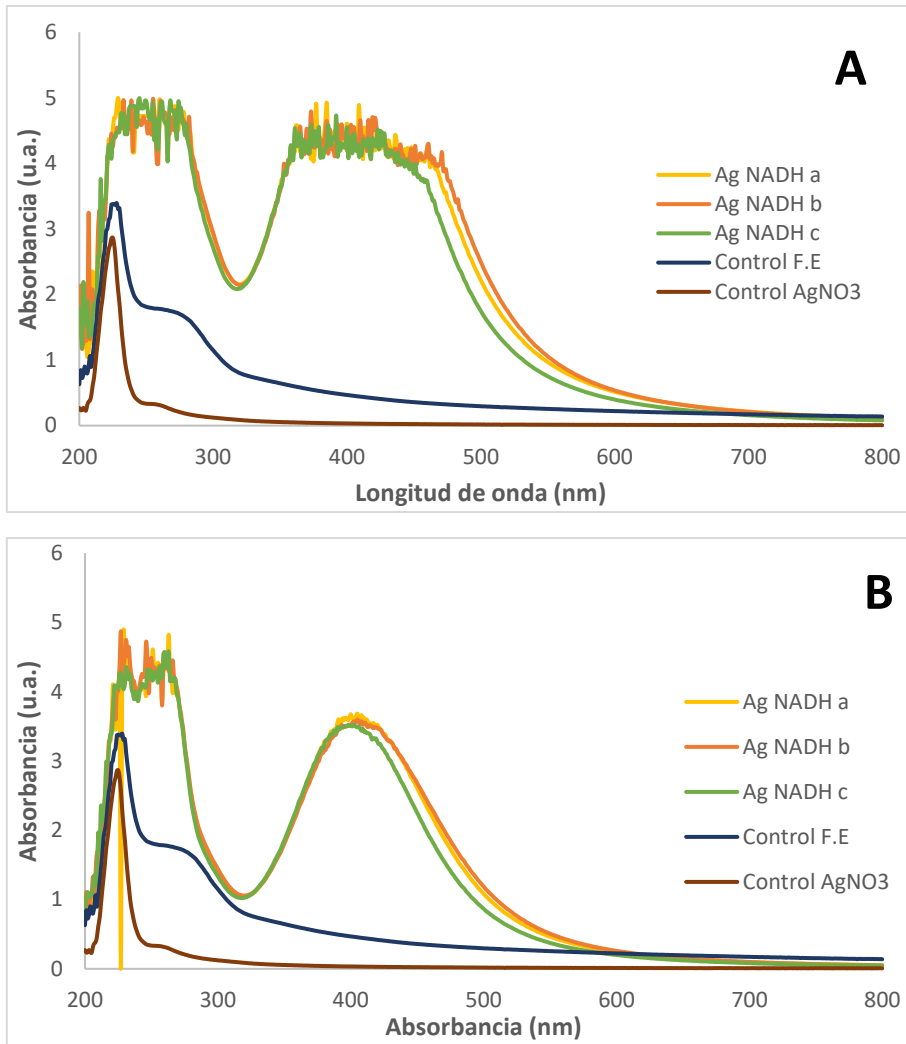


Figura 6. Espectros de absorción de nanopartículas de plata sintetizadas bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa, (30°C, 36 h, 150 rpm). A) Sin dilución. B) Dilución 1:2

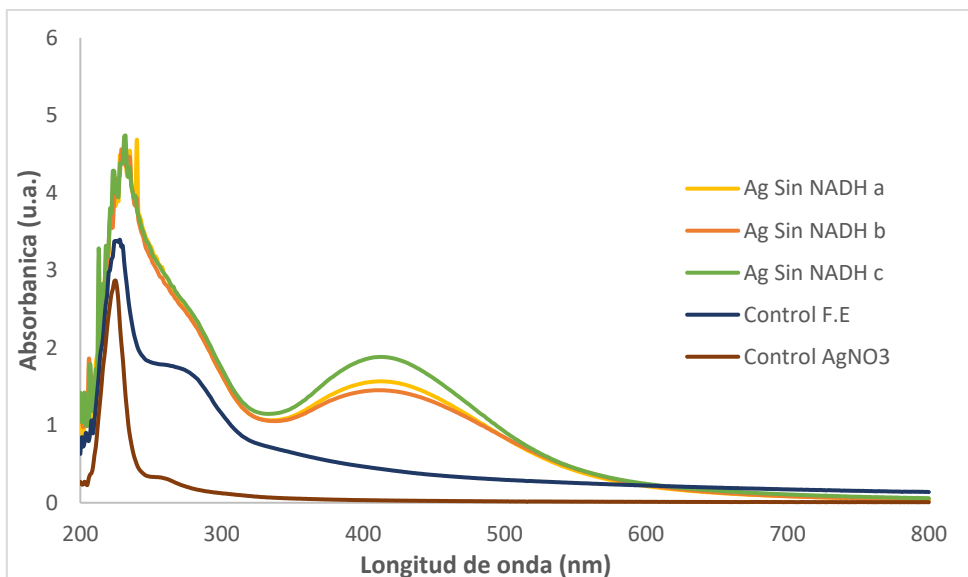


Figura 7. Espectros de absorción de nanopartículas de plata sintetizadas bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa sin adicionar NADH, (30°C, 36 h, 150 rpm).

4.3 Comparación de la producción de nanopartículas de oro y plata bajo condiciones distintas.

La figura 8, ilustra la síntesis de AuNPs y AgNPs bajo las dos condiciones empleadas en el estudio, donde las AuNPs (Fig. 8 A) producidas bajo condiciones iniciales muestran bandas con mayor intensidad de absorción, seguido de la muestra con NADH y por último la muestra sin NADH, esto se debe a que la síntesis de nanopartículas depende ampliamente de las condiciones ambientales, naturaleza del microorganismo y condiciones de actividad enzimática. Se ha demostrado que la producción de nanopartículas por vía fúngica, donde las moléculas involucradas son enzimas, estas trabajan mejor a temperaturas elevadas (Singh et al., 2016).

Por otro lado, en la Figura 8 B, se observa que las AgNPs producidas bajo condiciones de la enzima nitrato reductasa dependiente de NADH muestra bandas con mayor intensidad de absorción, seguido de la muestra bajo condiciones iniciales y por último la muestra sin NADH, (Hulkoti & Taranath, 2014) Informaron que la nitrato reductasa dependiente de NADH es responsable de la reducción de iones de plata a plata metálica, la reductasa dependiente de NADH puede actuar como portadora de electrones de NADH durante el proceso de reducción. En el proceso, NADH actuó como portador de electrones, y los iones de plata obtuvieron electrones de NADH a través de la NADH reductasa, y luego se redujeron a Ag^0 .

En ambos gráficos se aprecia claramente una banda de absorción alrededor de los 220 nm en todos los controles negativos, lo cual indica la presencia de aminoácidos aromáticos y puentes disulfuros de las proteínas. (Deendayal et al., 2003), señalan que esta observación indica la liberación de proteínas secretadas por el hongo en el filtrado extracelular. Las nanopartículas producidas en la solución son estabilizadas por dichas proteínas presentes en el filtrado extracelular.

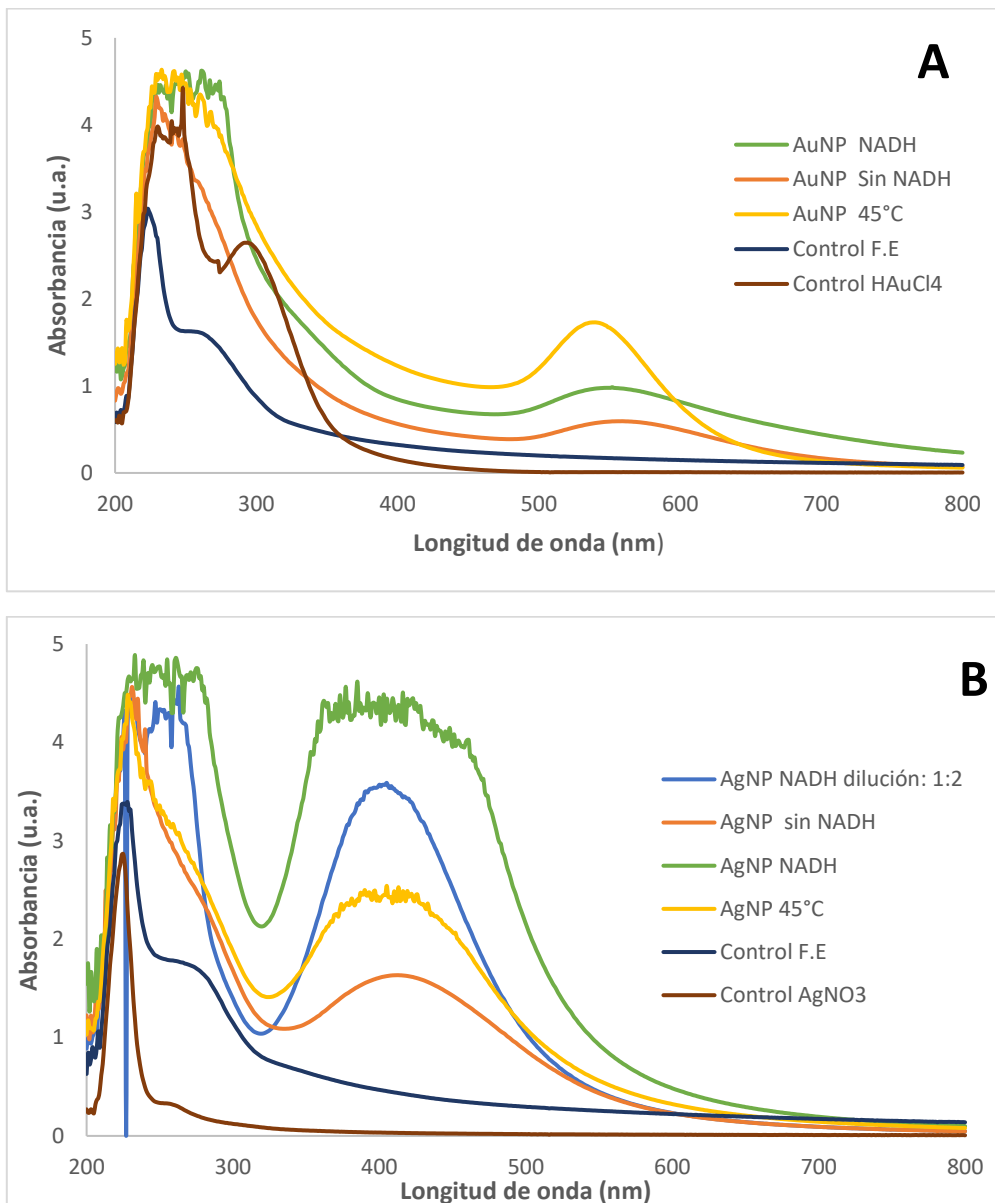


Figura 8. Espectros de absorción de nanopartículas metálicas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) sintetizadas a partir del FE de *A. alternata*, bajo las siguientes condiciones i) 45°C, 180 rpm, 72 h, 1 Mm sustrato, ii) 30 °C, 150 rpm, 36 h, 1 Mm sustrato. iii)) 30 °C, 150 rpm, 36 h, 1 Mm sustrato, 0.5 Mm NADH. A) nanopartículas de oro. B) Nanopartículas de plata.

CAPITULO 5: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusión.

El estudio demostró la capacidad de *Alternaria alternata* para producir nanopartículas de oro y plata bajo diferentes condiciones, mediante el análisis se concluyó que NADH y la reductasa dependiente de NADH fueron probablemente los factores clave para la biosíntesis de las nanopartículas metálicas sintetizadas en el estudio, ya que en estas pruebas fue donde se obtuvieron mejores resultados, sin embargo, la temperatura también fue un factor importante durante el proceso.

El potencial de utilizar nanopartículas metálicas en varios campos, aumenta la necesidad de producirlos a escala industrial y en procesos respetuosos con el medio ambiente, es por ello que la bio-síntesis de nanopartículas utilizando microorganismos, es una alternativa altamente comprometedora con el medio ambiente, ya que son capaces de producir biomoléculas extracelulares con alto poder reductor sin necesidad de usar disolventes o químicos tóxicos.

5.2 Recomendaciones.

Es bien sabido que la síntesis de nanopartículas utilizando microorganismos es un proceso bastante lento (varias horas e incluso unos pocos días) en comparación con el enfoque físico y químico, la reducción del tiempo de síntesis hará que esta ruta de biosíntesis sea mucho más atractiva.

El tamaño de las partículas y la monodispersidad son dos cuestiones importantes en la evaluación de la síntesis de nanopartículas. Varios estudios han demostrado que las nanopartículas formadas por microorganismos pueden descomponerse después de un cierto período. Por lo tanto, la estabilidad de las nanopartículas producidas por métodos biológicos merece un mayor estudio y debe mejorarse.

Los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares que median la síntesis de nanopartículas biológicas deben estudiarse en detalle para aumentar la tasa de síntesis y obtener el tamaño y la forma deseados de las nanopartículas.

FUENTES DE INFORMACIÓN.

- Alamilla-Martinez, D. G. (2019). Caracterización parcial de las biomoléculas de *Alternaria alternata* MVSS-AH-5 implicadas en la biorreducción de metales. *Tesis Maestría. CICATA-IPN-QRO.*
- Alamilla-Martinez, D. G. (2017). Estudio y evaluación de la capacidad de síntesis de nanopartículas de plata por hongos filamentosos. *Tesina de especialidad. CICATA-IPN-QRO.*
- Alamilla-Martinez, D., Rojas-Avelizapa, N., Dominguez-Lopez, I., Pool, H., Gomez-Ramirez, M. (2019). *Biosynthesis of iron nanoparticles (FeNPs) by Alternaria alternata MVSS-AH-5, 1-14.*
- Almajano, P., Carbo, R., & Jimenez, J. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tea Infusions. . *Food Chem.*, 55.
- Ashok, K., & Varma, A. (2009). A textbook of molecular biotechnology. *I.K. International*, 649.
- Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, 293-346.
- Beveridge, T. (1989). Role of Cellular Design in Bacterial Metal Accumulation and Mineralization. *Annual Review of Microbiology*, 147-171.
- Bhalerao, T. S. (2014). applications of iron nanomaterials in bioremediation and in detection of pesticide contamination. *International Journal of Nanoparticles*, 7(1), 73.
- Botello, L., & Garza, M. (2007). Biosíntesis de nanopartículas de ZnS utilizando cepas de hongos. *Ingenierias*, 16-22.
- Correa, D., Muñoz, I., & Castro, M. (2016). Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp. strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. *Microb Cell Fact*, 62-75.
- Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 293-346.
- Deendayal, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 313-318.
- Dowling, A. R., Clift, R., Grobert, N., Hutton, D. D., Oliver, R., O'Neill, B. O., . . . Welland, M. &. (2004). re, R. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. *The Royal Society*, 7-13.
- Fadeel, B., & Garcia, A. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Drug Deliv Rev.*, 62(3), 362-74.

- Henglein, A. (1993). Physicochemical Properties of Small Metal Particles in Solution: "Microelectrode" Reactions, Chemisorption, Composite Metal Particles, and the Atom-to-Metal Transition. *Journal of Physical Chemistry*.
- Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *small*, 1(5), 482-501.
- Hulkoti, N. &. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes- A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 474-483.
- Joo, J., Zhang, J., Yu, T., & Hyeon, T. (2003). Generalized and facile synthesis of semiconducting metal sulfide nanocrystals. *J. Am. Chem.*, 11100–11105.
- Khaydarov, R., Gapurova, O., & Estrin, Y. (2009). Antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by an electrochemical method. *Nanostructured materials for Advanced Technological Applications, Springer Science*, 215-216.
- Kon, K., & Rai, M. (2013). Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors. *Journal of Comparative Clinical Pathology Research*, 2(1), 160-174.
- Kulkarni, R., Shaiwale, N., & Deobagkar, D. (2015). Synthesis and extracellular accumulation of silver nanoparticles by employing radiation-resistant *Deinococcus radiodurans*, their characterization, and determination of bioactivity. *International Journal of Nanomedicine*, 963–974.
- Li, G., He, D., Qian, Y., Guan, B., & Gao, S. &. (2012). Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*. *International Journal of Molecular Sciences*., 466-476.
- Lou, J., Fu, L. P., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *molecules*, 5891–5935.
- Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M., & Mohamad, R. (2013). Green Biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles using seaweed aqueous extract. *Molecules*, 5954-5964.
- Mohamed, Y. M., Azzam, A. M., Amin, B. H., & Safwat, N. A. (2015). Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternata* and its antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 1234–1241.
- Narayanan, K., & Sakthivel, N. (2010). Phytosynthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Material Characterization*, 1232-1238.
- Oza, G. P., & Ambernath, W. (2012). Extracellular Fabrication of Silver Nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* and its Antimicrobial Assay. *Advances in Applied Science Research*, 3(3), 1776–1783.
- Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., & García Lacarra, T. (2012). Importancia del genero *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutricion Hospitalaria*., 1772–1781.
- Ramezani, F. (2010). Mechanistic Aspects of Biosynthesis of Nanoparticles . *Nanocon*, 12-14.

- Rojas-Avelizapa, N. G., Otamendi-Valdez, J., & Gómez-Ramírez, M. (2017). Metal leaching from a spent catalyst by *Alternaria alternata*. *Mexican Journal of Biotechnology.*, 2(2), 221-231.
- Salunke, B. K., Sawant, S., & Lee, S. I. (2016). Microorganisms as efficient biosystem for the synthesis of metal nanoparticles: current scenario and future possibilities. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 32(5), 88.
- Sandoval-Cárdenas, I., Gómez-Ramírez, M., & Rojas-Avelizapa N. (2017). Use of a sulfur waste for biosynthesis of cadmium sulfide quantum dots with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Materials Science in Semiconductor Processing.*, 63, 33-39.
- Sandoval-Cardenas, D. (2017). Síntesis por vía microbiana de nanopartículas de sulfuro de cadmio a partir de un residuo residual. *Tesis Maestría. CICATA-IPN-QRO.*
- Sarkar, J., Ray, S., & Laskar, A. (2012). Mycogenesis of gold nanoparticles using a phytopathogen *Alternaria alternata*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4), 637–643.
- Schmid, G. (2004). Nanoparticles. From theory to application. *Nanochemistry.*
- Sripriya, J., Anandhakumar, S., Achiraman, S., Antony, J., Siva, D., & Raichur, A. (2013). Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics.*, 457, 206-213.
- Tahrioui, A. (2016). Nanotecnología y sus potenciales aplicaciones en microbiología. *Universidad de Sevilla.*
- Vaidyanathan, R., Gopalram, S., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S., & Gurunathan, S. (2010). Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity. *reductase activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 335-341.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N., & Varadarajan, P. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*, 1413-1418.
- Wachs, I. E. (2001). Characterization of catalytic materials. New York: Momentum Press. *Journal of Materials Science*, 6583.
- Wang, Y., & Herron, N. (1991). Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties. *J. Phys. Chem*, 525-532.
- Wei, L., Lu, J., & Chen, Z. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today*, 595-601.
- Yañez, M., & Ibañez, M. (2016). *Biosíntesis de nanopartículas a partir de extractos acuosos vegetales*. Mexico: Universidad Nacional De Mexico.
- Yeh, Y., Creran, B., & Rotell, V. (2012). Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880.