

# Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada\*

Ernestina Castro-Longoria\*\*

**RESUMEN:** En la nanotecnología actualmente se investiga el uso de diversos materiales biológicos como agentes reductores para la producción de nanopartículas metálicas (NPs), como una alternativa ecoamigable. Entre los agentes biológicos estudiados, los hongos y los extractos de plantas han sido identificados como excelentes candidatos para este propósito. Los hongos presentan una serie de ventajas sobre otros sistemas biológicos, tales como una alta tasa de crecimiento, requieren de nutrientes simples y son de fácil manejo en el laboratorio. Hasta el momento, más de 50 especies de hongos han demostrado una excelente capacidad de biorreducción para producir NPs metálicas. El hongo *Neurospora crassa* se ha utilizado con éxito para producir NPs de diversos metales. Hoy en día se exploran las posibles aplicaciones de las NPs generadas mediante métodos ecoamigables, en particular las nanopartículas de plata (AgNPs) por su excelente actividad antimicrobiana. Sin embargo, a pesar de los avances en este campo todavía hay mucho trabajo por hacer, sobre todo en la síntesis de NPs biocompatibles para su uso potencial en biomedicina.

**PALABRAS CLAVE:** Nanopartículas, métodos ecoamigables, antimicrobianos, hongos, *Neurospora crassa*.

**ABSTRACT:** In nanotechnology the use of biological material as reducing agents for the production of metallic nanoparticles (NPs) is subject of current research. Among the biological agents examined, fungi and plant extracts have been identified as excellent candidates for this purpose. Fungi present a number of advantages over other biological systems such as a rapid growth rate, simple nutrient requirements and easy handling of biomass/cultures. So far, more than 50 fungal species have demonstrated excellent bioreducing capacity to produce metallic NPs. The fungus *Neurospora crassa* has been successfully used to produce metallic NPs and the potential applications of such NPs are currently explored, particularly silver nanoparticles (AgNPs) for their excellent antimicrobial activity. Despite the advances in this field, there is still much work to be done, especially in finding biocompatible NPs for their potential use in biomedicine.

**KEYWORDS:** Nanoparticles, ecofriendly methods, antimicrobial, fungi, *Neurospora crassa*.

En el Departamento de Microbiología (DM) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), se utilizan hongos como modelos experimentales para entender problemas fundamentales de crecimiento y diferenciación de los seres vivos. Como un uso adicional, se

---

Recibido: 28 de marzo de 2016. Aceptado: 9 de mayo de 2016.

\* Algunas de las investigaciones realizadas contaron con apoyo parcial del proyecto SEP-CONACYT CB2011/169154. Gracias al Dr. Héctor Silva Pereyra por el apoyo para análisis de muestras de HRTEM, al M.C. Juan Manuel Martínez Andrade por los análisis de SEM y al LINAN-IPICYT.

\*\* Departamento de Microbiología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, México. Correspondencia: (ecastro@cicese.mx).

está investigando la utilización de estos organismos en la nanotecnología. Los hongos han sido identificados como una excelente alternativa, ecoamigable, para la producción de nanopartículas (NPs) de diversos metales, pues poseen una excelente capacidad de biorreducción. Su uso presenta una serie de ventajas sobre otros sistemas biológicos utilizados en la síntesis de NPs, como son su alta tasa de crecimiento, requieren medios de cultivo simples, y su cultivo es de fácil manejo. Además, por ser organismos que degradan materia orgánica, tienen el potencial de secretar enzimas que intervienen en la formación y estabilización de las NPs.

En el uso de hongos para la producción de NPs metálicas se han utilizado con éxito diferentes protocolos, los cuales incluyen ya sea la biomasa fúngica, el filtrado libre de células, el extracto de hongos o algunas moléculas purificadas, lo que representa una amplia gama de posibles aplicaciones. En particular, se ha encontrado que las NPs de plata poseen una excelente actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus, incluso contra microorganismos multirresistentes. Sin embargo, en esta línea de investigación todavía queda mucho por hacer, lo que le brinda al DM, al igual que a todos los interesados en el tema, un campo fértil de investigación en el desarrollo de nuevos y mejores protocolos ecoamigables, que permitan controlar la forma y el tamaño de las NPs. Así como también realizar investigaciones respecto a las aplicaciones de estos bionanomateriales, sobre todo en el área biomédica.

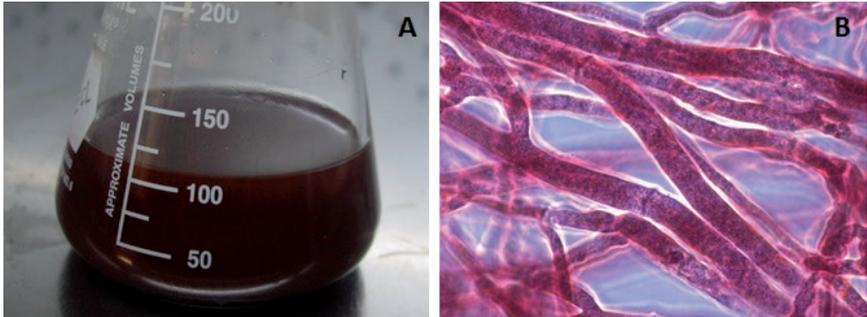
## Líneas de investigación relacionadas con la nanotecnología

Si bien se ha participado en el desarrollo de investigación que involucra el uso de otros agentes biológicos, hasta el momento la principal línea de investigación en el área de la nanotecnología ha sido el uso de hongos para la biosíntesis y producción de NPs metálicas, caracterización de las mismas y sus posibles aplicaciones.

Algunos de los temas de investigación que se han atendido son:

- **Biosíntesis de NPs metálicas mediante el uso de la biomasa fúngica.** La biosíntesis de NPs metálicas mediante el uso de hongos fue reportada por primera vez en el 2001. Desde entonces, varias especies de hongos han sido utilizadas para verificar la capacidad de reducción que poseen. En el DM se utiliza particularmente el hongo *Neurospora crassa* como organismo modelo. La biomasa de este microorganismo se ha utilizado para la producción de NPs de plata, oro, platino, cobre y paladio. La figura 1 muestra un ejemplo de la biomasa de *N. crassa* empleada para la producción de nanopartículas oro.
- **Biosíntesis de NPs metálicas mediante el uso de extracto de hongos.** Para que los métodos ecoamigables puedan competir con los métodos físicos y químicos es necesario desarrollar protocolos más eficientes para la producción de NPs metálicas. Se ha propuesto el

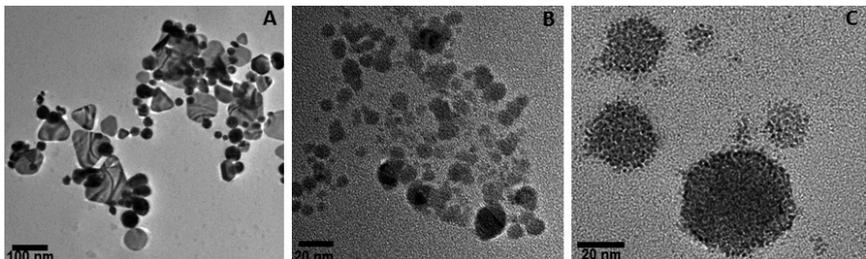
**FIGURA 1.** Biomasa del hongo *Neurospora crassa* expuesta a  $\text{HAuCl}_4$  durante 24 h (A) e hifas analizadas bajo microscopía de campo claro (B).



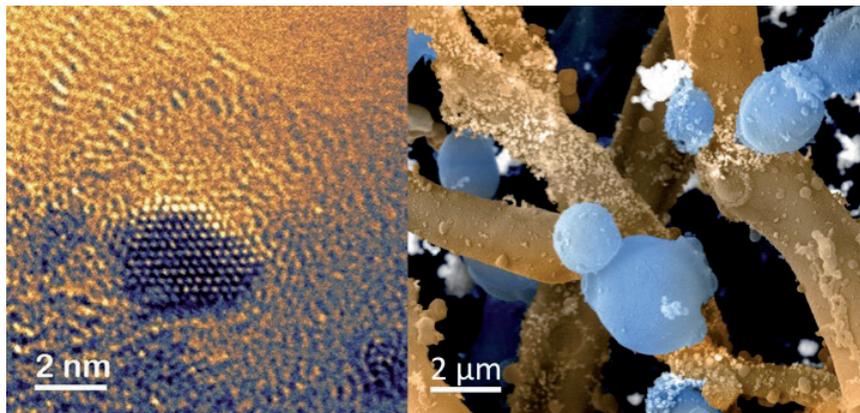
uso de los cultivos líquidos libres de biomasa y de extractos preparados a partir de la biomasa libre de medio de cultivo, además de enzimas purificadas a partir de algunas especies de hongos. En el DM hemos trabajado con extractos del hongo *N. crassa*, logrado muy buenos resultados (figura 2). Algunos de los resultados más importantes incluyen la obtención de NPs de oro de diversas formas (figura 2A) las cuales se utilizaron para la amplificación de señales Raman de moléculas adsorbidas (SERS). También se logró la obtención de AgNPs de un rango de tamaño pequeño (figura 2B) las cuales poseen excelente actividad antifúngica contra especies del hongo patógeno *Candida* y actualmente se analiza su capacidad antibacteriana. Los nanoagregados de platino (figura 2C) que se obtuvieron mediante el extracto del hongo tuvieron un rango de tamaño de 17–76 nm, sin embargo, su posible aplicación no fue evaluada.

- **Uso de nanopartículas de plata como agente antimicrobiano.** El desarrollo de nuevos métodos para la producción de NPs nos ha permitido sintetizar AgNPs de 5 nm de tamaño promedio (figura 3), las cuales han sido utilizadas con éxito como agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de especies del hongo patógeno *Candida*

**FIGURA 2.** Micrografías de HRTEM de nanopartículas de oro (A), plata (B) y platino (C), biosintetizadas mediante el uso de extractos del hongo *Neurospora crassa*.



**FIGURA 3.** Micrografía de HRTEM de una nanopartícula de plata (izquierda) y micrografía de SEM del hongo *Candida albicans* expuesto a nanopartículas de plata (derecha). Imágenes con pseudo-color.



(figura 3). Se ha reportado que las AgNPs de tamaños menores a 10 nm son más eficientes como agentes antimicrobianos por la mayor superficie que pueden cubrir, además de liberar una mayor cantidad de iones ( $\text{Ag}^+$ ), los cuales son microbicidas incluso a bajas concentraciones.

## Colaboraciones y proyectos

La pertinencia y relevancia de la investigación que se ha venido realizando en el área de la nanotecnología ha fomentado la colaboración multidisciplinaria con investigadores de diferentes centros de investigación del país, tal es el caso del Dr. Miguel Avalos Borja, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, experto en cristalografía, el Dr. Alfredo Rafael Vilchis Néstor, de la Universidad Autónoma del Estado de México, experto en química de materiales, el Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, experto en microbiología experimental odontológica, el Dr. Jorge Santamaría, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, experto en fisiología vegetal molecular.

Las capacidades académicas y fortalezas de estas colaboraciones han permitido realizar proyectos de investigación en temas como:

- El uso de NPs de oro biosintetizadas por medio del extracto de *N. crassa* para la amplificación de señales Raman de moléculas adsorbidas (SERS).
- La formación de nanopartículas de plomo por el lirio acuático *Salvinia minima*.
- El análisis ultraestructural del hongo patógeno *Candida albicans* expuesto a las NPs de plata.

FIGURA 4. Perspectivas del área de trabajo dentro del Laboratorio del Departamento de Microbiología.



- El uso de NPs de plata en tratamientos odontológicos.
- La producción de NPs de plata de tamaño controlable mediante el uso del extracto de *N. crassa*.

### Instrumentos de protección de propiedad intelectual solicitados

El potencial que tiene la nanotecnología en diferentes aplicaciones, nos ha permitido incursionar en la generación de biotecnologías que involucran el desarrollo y uso de una solución de NPs de plata para tratamientos odontológicos. La patente de esta solución se encuentra en trámite ante el IMPI.

### Infraestructura

En el Departamento de Microbiología se cuenta con un laboratorio común (figura 4), en el que los equipos analíticos existentes pueden ser utilizados por todo el personal académico del departamento y nuestros estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado. Parte primordial para el desarrollo de nuestras investigaciones es contar con diferentes tipos de microscopios, desde microscopios compuestos y estereoscópicos, para el trabajo rutinario, hasta los más especializados, como un microscopio confocal (Olympus, FV1000), dos microscopios de fluorescencia de reflexión interna total (Olympus, IX81 TIRF y Nikon, Eclipse Ti TIRF) y un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-7500). Para análisis de cortes finos contamos con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut R), así como con todo el material necesario para la preparación y análisis de muestras biológicas. Algunos de estos equipos se muestran en la figura 5. Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y de microscopía electrónica de barrido (SEM) se cuenta con el apoyo del LINAN-IPICYT.

**FIGURA 5.** Imágenes de algunos de los equipos con los que cuenta el Departamento de Microbiología. Microscopio confocal (A), microscopio de fluorescencia de reflexión interna total (B), microscopio electrónico de transmisión (C), ultramicrotomo (D).



## Formación de recursos humanos

Parte fundamental en las actividades de investigación en el área de nanotecnología ha sido la formación de recursos humanos a través de la docencia, la dirección de tesis a estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado, y mediante programas de servicio social en sus etapas básica y profesional para estudiantes de licenciatura.

## Lista de trabajos generados

- Acedo-Valdez M.R. (2010). Biosíntesis de nanopartículas de Cu y Pd mediante el hongo *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. 62 pp.
- Castro-Longoria E., Vilchis-Nestor A.R., Avalos-Borja M. (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83: 42-48.
- Castro-Longoria E., Moreno-Velásquez S.D., Vilchis-Nestor A.R., Arenas-Berumen E., Avalos-Borja M. (2012). Production of platinum nanoparticles and nanoaggregates using *Neurospora crassa*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(7), 1000-1004.

- Castro-Longoria E., Trejo-Guillén K., Vilchis-Nestor A.R., Avalos-Borja M., Andrade-Canto S.B., Leal-Alvarado D.A., Santamaría J.M. (2014). Biosynthesis of lead nanoparticles by the aquatic water fern, *Salvinia minima* Baker, when exposed to high lead concentration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 277-283. ISSN: 0927-7765.
- Castro-Longoria E. Fungal biosynthesis of nanoparticles, a cleaner alternative. En Purchase, D. (ed.) *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology*. Springer. (En prensa).
- Martínez-Andrade J.M. (2015). Evaluación *in vitro* de una solución irrigante con nanopartículas de plata. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 135 pp.
- Moreno-Velásquez S.D. (2010). Biosíntesis de nanopartículas de platino mediante el uso del hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora, 79 pp.
- Nolasco-Arizmendi V., Morales-Luckie R., Sánchez-Mendieta V., Hinnestroza J.P., Castro-Longoria E., Vilchis-Nestor A.R. (2012). Formation of silk-gold nanocomposite fabric using grapefruit aqueous extract. *Textile Research Journal*. DOI: 10.1177/0040517512461697.
- Qvester K., Avalos-Borja M., Vilchis-Nestor A.R., Camacho-López M.A., Castro-Longoria E. (2013). SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLoS ONE*, 8(10): 1-8, ISSN: 1932-6203
- Qvester K., Avalos-Borja M., Castro-Longoria E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54-55, 1-27. DOI 10.1016/j.micron.2013.07.003, ISSN: 0968-4328
- Qvester K. (2014). The use of *Neurospora crassa* soluble proteins as bioreducing agent for the production of gold and silver nanostructures. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 166 pp.
- Qvester K., Avalos-Borja M., Castro-Longoria E. (2016). Controllable synthesis of silver nanoparticles using fungal extract. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 7: 118-125. doi.org/10.4236/jbnb.2016.72013
- Vazquez-Muñoz R. (2013). Interacción de las nanopartículas de plata con el hongo patógeno *Candida albicans*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 114 pp.
- Vazquez-Muñoz R., Avalos-Borja M., Castro-Longoria E. 2014. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(10): e108876, ISSN: 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0108876.

## Principales logros

Dentro de los principales logros obtenidos se incluyen:

- La producción de NPs metálicas mediante métodos ecoamigables.
- La elaboración de una novedosa solución a base de NPs de plata para uso en tratamientos odontológicos, lo que llevó al registro de una patente ante el IMPI.
- Formación de recursos humanos de alto nivel con una formación multidisciplinaria.
- Creación y consolidación de una nueva línea de investigación en el CICESE, “La producción de nanopartículas metálicas mediante métodos ecoamigables y su aplicación en biomedicina”.
- Creación y consolidación de un grupo de trabajo multidisciplinario a nivel interinstitucional.
- Reconocimiento a nivel internacional, lo cual ha dado lugar a extenderse más allá de las fronteras con la reciente integración de la Dra. Diane Purchase de la Universidad de Middlesex en Londres, con quien estamos planeando la aplicación de NPs en procesos de biorremediación mediante el uso de los hongos.
- Inicio de una colaboración con médicos del Hospital General de Tijuana para la elaboración de una solución a base de NPs de plata para la inhibición de microorganismos resistentes.

## Perspectivas

Nuestras perspectivas en el mediano y largo plazo se enfocarán en el avance de la línea de investigación en el desarrollo de métodos ecoamigables para la síntesis de NPs metálicas, utilizando principalmente a los hongos como agentes reductores, asimismo utilizarlos en biorremediación de metales pesados. También se planea continuar con la investigación y desarrollo de nuevas aplicaciones de las NPs biosintetizadas en el área biomédica.

## Sitios de interés relacionados con el Departamento de Microbiología

Página institucional: <<http://www.cicese.edu.mx/#>>.

### Página del Departamento de Microbiología:

<<http://www.cicese.edu.mx/int/index.php?mod=inv&op=ac&dep=6801>>.