

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología celular y molecular**

**Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro y su
evaluación en espectroscopía Raman reforzada por efectos de
superficie (SERS)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jacqueline Olvera Aripez

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Jacqueline Olvera Aripez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Dr. Santiago López Camacho

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Dra. Katrin Quester



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jacqueline Olvera Aripez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Microbiología celular y molecular.

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro y su evaluación en espectroscopía Raman reforzada por efectos de superficie (SERS)

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

La espectroscopía Raman reforzada por efectos de superficie (SERS) es una técnica sensible a la superficie, que utiliza superficies metálicas rugosas o nanoestructuras para mejorar el esparcimiento Raman de las moléculas. Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan propiedades SERS, por lo que surge la necesidad de desarrollar alternativas de síntesis por métodos más amigables con el ambiente. Una alternativa es utilizar AuNPs sintetizadas mediante el uso de los hongos, ya que se ha demostrado que podrían utilizarse para SERS. El objetivo principal del proyecto es determinar la capacidad de las AuNPs sintetizadas mediante diferentes especies de hongos filamentosos, para mejorar la medición del espectro Raman. Para ello, se sintetizaron AuNPs a diferentes parámetros de temperatura, pH y tiempos de reacción y se analizaron sus propiedades SERS. Las AuNPs se sintetizaron utilizando el sobrenadante de diferentes hongos: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Alternaria alternata* y *Ganoderma sessile*. Se corroboró la producción de AuNPs mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Visible). El plasmón de superficie de las AuNPs se localizó entre los 525 nm a 580 nm. Mediante dispersión de luz dinámica (DLS) se analizó el tamaño y potencial Z. Las AuNPs sintetizadas presentaron tamaños promedio de 73 nm a 905 nm. La carga eléctrica fue de -1.95 mV a -29.9 mV. Por último, se analizó el tamaño y la morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las AuNPs presentaron diferentes morfologías (esféricas, semi-esféricas, triangulares, hexagonales e irregulares) con un rango de tamaño de 10 a 180 nm. Para la evaluación de las propiedades SERS se utilizó un sistema micro Raman a una longitud de onda de 532 nm. En general, las AuNPs sintetizadas por diferentes hongos presentaron excelentes propiedades SERS. Las AuNPs sintetizadas con el sobrenadante de *T. asperellum*, *A. alternata* y *G. sessile* presentaron un mayor incremento en la intensidad Raman del azul de metileno con un factor de mejora de 11.25, 12.71 y 13.06, respectivamente. En conclusión, se observó que a una longitud de onda de 532 nm, las AuNPs con mayor distribución de formas esféricas y tamaños menores a 50 nm presentaron mayor capacidad para aumentar el efecto SERS del azul de metileno.

Palabras clave: Nanopartículas, propiedades SERS, métodos biológicos.

Abstract of the thesis presented by **Jacqueline Olvera Aripez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life sciences with orientation in cellular and molecular microbiology

Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles and their evaluation in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a surface-sensitive technique that uses rough metallic surfaces or nanostructures to enhance the Raman scattering of molecules. Gold nanoparticles exhibit SERS properties. Therefore, an environmentally friendly alternative to use gold nanoparticles is their production using biological methods. Fungi have been shown to be excellent candidates for the synthesis of metallic nanoparticles, and it has been demonstrated that they could be used for SERS. For that reason, the main objective of the project is to determine the ability of AuNPs synthesized by different species of filamentous fungi to improve the measurement of Raman spectra. For this purpose, the SERS properties of AuNPs synthesized at different temperatures and pH were analyzed. AuNPs were synthesized using the supernatant of different fungi: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Alternaria alternata* and *Ganoderma sessile*. The production of AuNPs was corroborated by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Visible) and by dynamic light scattering (DLS), the size and Z-potential of the AuNPs were analyzed. AuNPs synthesized presented average sizes from 73 nm to 685 nm and 107 to 905 nm, respectively. The superficial electrical charge of the AuNPs determined the stability of the AuNPs presenting values from -1.95 mV to -29.9 mV, approximately. Finally, the size and shape of the AuNPs were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The AuNPs synthesized using different fungi presented spherical, quasi-spherical, and triangular and some different shapes with a size range from 10 to 180 nm. The obtained AuNPs were purified at 400 °C. A micro Raman system at a wavelength of 532 nm was used for the evaluation of SERS properties. The AuNPs synthesized by different fungi presented excellent SERS properties. AuNPs synthesized with the supernatant of *T. asperellum*, *A. alternata* and *G. sessile* presented a higher increase in the Raman intensity of methylene blue with an enhancement factor of 11.25, 12.71 y 13.06, respectively. In conclusion, it was observed that at a wavelength of 532 nm, the AuNPs with a greater distribution of spherical shapes and sizes smaller than 50 nm presented a greater capacity to increase the SERS effect of methylene blue.

Keywords: Nanoparticles, SERS properties, biological methods.

Dedicatoria

Para mí. Que todo lo que desee; no exista límite que me impida lograrlo. Mi éxito y mi felicidad dependen de mí.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica, el acceso a las instalaciones, y los medios para desarrollar el proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo mediante el programa de becas.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por compartir su pasión y entusiasmo en el área de investigación, por los consejos durante mi estadía en el posgrado, por siempre estar disponible para aclarar dudas y por su paciencia.

A mis asesoras, Dra. Olga Callejas y Dra. Katrin Quester; por su tiempo, comentarios y observaciones. A mi asesor, Dr. Santiago Camacho por la disposición de su equipo de trabajo y la excelente asesoría.

A todo el personal técnico por todas sus aportaciones y el apoyo para terminar mi proyecto. A mis compañeros de laboratorio de microbiología por los consejos y las observaciones.

Un agradecimiento especial a la mujer que me motiva todos los días, a mi mamá Jacqueline Arippez Zamora por brindarme su apoyo incondicional. A mi papá Juan Olvera, por compartir aprendizajes y estudiar los temas que no entendía para luego explicármelos. A Luis Reveles, mi hermano y toda mi familia por apoyarme siempre. A mis amigas por sus locuras y ser parte de esta etapa tan especial. A mi novio Rodrigo López Verdugo, por acompañarme y motivarme cuando creía que no podría.

A Dios por darme salud y fuerza para continuar.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	vii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Síntesis de nanopartículas por métodos biológicos.....	2
1.2 Propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas.....	2
1.3 Esparcimiento Raman.....	4
1.4 Aplicación de las nanopartículas en Biomedicina.....	6
1.5 Antecedentes.....	7
1.6 Justificación.....	10
1.7 Hipótesis.....	10
1.8 Objetivos.....	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Cepas de hongos y medios de cultivo.....	12
2.2 Obención de sobrenadante.....	12
2.3 Síntesis de nanopartículas de oro biológicas.....	13
2.4 Caracterización de nanopartículas de oro.....	14
2.5 Ecuación SERS.....	15
Capítulo 3. Resultados.....	17

3.1	Producción de nanopartículas de oro mediante hongos filamentosos.....	17
3.2	Caracterización de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos a temperatura ambiente.....	19
3.3	Caracterización de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos a 60 °C.....	24
3.4	Evaluación SERS.....	29
Capítulo 4. Discusión		34
Capítulo 5. Conclusiones		37
Literatura citada.....		38

Lista de figuras

Figura	Página
1. Representación gráfica del mecanismo de la resonancia plasmónica de superficie de una nanopartícula metálica esférica.....	3
2. Representación gráfica del plasmón de superficie en AuNPs esféricas con diferentes tamaños.....	4
3. Representación gráfica del mecanismo SERS.....	5
4. Representación gráfica de la eficacia de las AgNPs de aumentar la intensidad del espectro SERS del azul de metileno (MB).....	9
5. Espectro Raman del azul de metileno.....	15
6. Nanopartículas de oro sintetizadas a temperatura ambiente.....	18
7. Nanopartículas de oro sintetizadas a 60 °C.....	18
8. Representación gráfica del espectro de absorción de AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente.....	19
9. Representación gráfica de la distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente.....	20
10. Representación gráfica de la distribución del potencial Z de AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente.....	21
11. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>A. alternata</i>	22
12. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>T. atroviride</i>	23
13. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>B. cinerea</i>	23
14. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>G. sessile</i>	23
15. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>T. asperillum</i>	24
16. Representación gráfica del espectro de absorción de AuNPs sintetizadas a a 60 °C.....	24
17. Representación gráfica de la distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas a 60 °C.....	25
18. Representación gráfica de la distribución del potencial Z de AuNPs sintetizadas 60 °C.....	26

19.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>A. alternata</i>	27
20.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>T. atroviride</i>	27
21.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>B. cinerea</i>	28
22.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>G. sessile</i>	28
23.	Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso <i>T. asperillum</i>	28
24.	Espectro Raman del azul de metileno (MB) al 0.01 %.....	29
25.	Espectros Raman del MB + sobrenadante y AuNPs sin tratamiento.....	30
26.	Espectros SERS del azul de metileno con AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente.....	31
27.	Espectros SERS del azul de metileno con AuNPs sintetizadas a 60 °C.....	32
28.	Análisis comparativo del efecto SERS de las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente y 60 °C.....	33

Capítulo 1. Introducción

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son estructuras metálicas que poseen un tamaño menor a 100 nm en una de sus dimensiones. En los últimos años, las nanopartículas de oro han sido de gran interés, debido a su potencial en una amplia gama de aplicaciones como: catálisis, bioimagen, agentes antimicrobianos, agentes anticancerígenos, biosensores, antioxidantes y anticoagulantes (Elegbede et al., 2018). Con el fin de desarrollar nanopartículas de oro con nuevas propiedades o una función mejorada de sus propiedades para aplicaciones específicas en diferentes áreas (medicina, electrónica, óptica, etc.), se ha buscado desarrollar métodos de síntesis que permitan modificar la forma, tamaño y su entorno (química superficial) (Schröfel et al., 2014). Los métodos para sintetizar las nanopartículas incluyen: métodos físicos, la síntesis química y actualmente se exploran los métodos de síntesis biológica (Hasan., 2015).

La ablación láser es un método físico que utiliza la irradiación de alta intensidad para remover material en una superficie sólida. La energía del láser es absorbida, por lo que el material se calienta y se evapora o sublima. Al incrementar la intensidad del láser, el material puede ionizarse y cambiar de un estado sólido a plasma de manera instantánea. Las propiedades ópticas del material determinan la profundidad de absorción de la energía del láser y por lo tanto la cantidad de material eliminado. Otro método físico consiste en la condensación de gas inerte que utiliza una cámara de ultra vacío para evaporar los metales en crisoles separados. Los átomos de los metales pierden su energía cinética dentro de la cámara, y por lo tanto, se acumulan y se condensan en forma de pequeños cristales (Prathna., et al 2010).

El método químico más utilizado para la síntesis de nanopartículas metálicas se basa en la reacción de reducción de sales metálicas. El tamaño y la forma de las nanopartículas pueden ser controlados mediante la modificación de los siguientes parámetros: concentración de las sales metálicas, temperatura, pH, agente reductor, etc. (Mongue, 2009). La síntesis química requiere el uso de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante. Para la síntesis de las nanopartículas de oro mediante métodos químicos se utiliza como precursor el ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) y como agente reductor, el citrato trisódico (Na_3Ct). Además, se utilizan otros agentes reductores de naturaleza inorgánica como; el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) (Corzo, 2012). Para evitar la aglomeración y controlar la forma y tamaño de las nanopartículas, se utilizan surfactantes, polímeros y dendrímeros, como agentes estabilizantes (Mongue, 2009). No obstante, los métodos físicos y químicos tienen efectos adversos, debido a los altos consumos de energía y a la liberación de subproductos tóxicos y peligrosos que pueden ocasionar daños al medio ambiente. El agente reductor de naturaleza inorgánica, el borohidruro de sodio, al entrar en

contacto con el agua produce gases inflamables (recuperado de hoja de seguridad de reactivos Meyer, 2015). Por lo que, recientemente, el uso de métodos de síntesis biológicos resulta ser una alternativa a los métodos de síntesis física y química de las nanopartículas metálicas ya que son más amigables con el medio ambiente. Los métodos de síntesis biológicos consisten en utilizar organismos como plantas y algas, así como una amplia variedad de microorganismos, los cuales incluyen: bacterias, hongos y levaduras.

1.1 Síntesis de nanopartículas por métodos biológicos

La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando material biológico es posible ya que esto permite la reducción de los iones metálicos para la formación de las nanoestructuras. Por ejemplo, las algas se han utilizado ya que tienen polisacáridos mucilaginosos en su pared celular que a través de sus grupos carboxilos expuestos, captan los metales pesados (Menon et al., 2017). Se ha reportado que la suspensión celular seca de la microalga *Chlorella vulgaris* produce nanopartículas metálicas con un tamaño de 9 a 20 nm. Por otro lado, las bacterias producen nanopartículas metálicas mediante un proceso de biorreducción. Los iones metálicos se reducen a nanopartículas metálicas mediante las enzimas reductoras extracelulares (enzima reductasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótida (NADH) y nitrato) producidas por las bacterias. Actualmente, se ha visto que la síntesis mediante hongos filamentosos resulta ser una alternativa potencial, debido a la capacidad de estos microorganismos de llevar a cabo la síntesis extracelular de las nanopartículas de oro (Castro et al., 2014). Los hongos secretan una gran cantidad de proteínas y metabolitos secundarios, los cuales podrían participar como agentes reductores de los iones metálicos. Además, al utilizar hongos filamentosos se pueden modificar, en cierta medida, el tamaño y la forma de las nanopartículas mediante el control de diferentes parámetros (concentración de sustrato, pH, temperatura y tiempo de reacción). Otra ventaja de utilizar hongos para la biosíntesis de nanopartículas metálicas es la facilidad de ser cultivados a gran escala, lo que permite producir una gran cantidad de enzimas mediante la biomasa obtenida (Hulkoti et al., 2014).

1.2 Propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas tienen características únicas que están relacionadas a la dimensión, forma y el entorno químico de las nanopartículas (Elahi et al., 2018). El plasmón de superficie (SPR), es una característica propia de las nanopartículas metálicas que, al ser excitado por un haz de luz monocromática

de la longitud de onda adecuada, genera oscilaciones colectivas de los electrones libres de la superficie de las nanopartículas.

El campo eléctrico oscilante de la luz incidente separa las cargas en los electrones móviles desplazados (negativas) de la superficie de las nanopartículas de las cargas internas, lo que induce un campo electromagnético local, que a su vez interacciona con los electrones libres de la superficie de la nanopartícula (Figura 1) (Cruz et al., 2011).

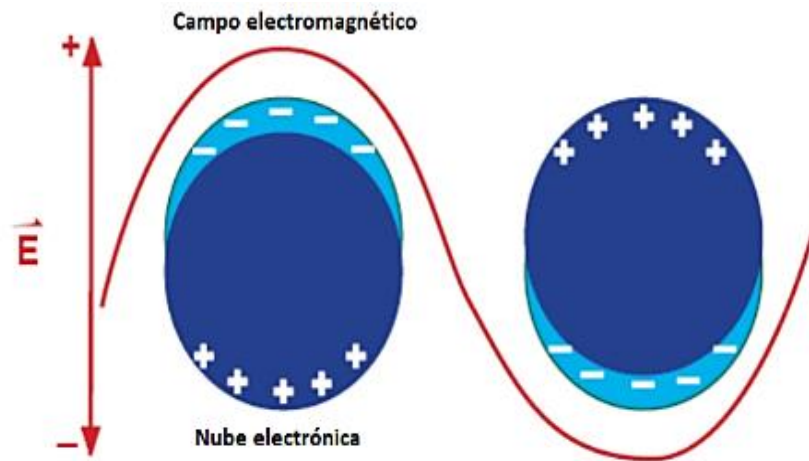


Figura 1. Representación gráfica del mecanismo de la resonancia electromagnética de una nanopartícula metálica esférica (Zhong et al., 2009).

El SPR puede medirse por espectroscopía ultravioleta-visible, debido a la absorción inducida por la luz incidente. La intensidad del SPR y la longitud de onda donde se localiza dependen de la distribución de los electrones en la superficie, y por lo tanto la forma de las nanopartículas. En el caso de las NPs de oro con forma esférica o semiesférica con tamaños menores a 50 nm, la resonancia plasmónica de superficie, se encuentra en una longitud de onda de 530 nm, aproximadamente. Al aumentar el tamaño de las nanopartículas, la longitud de onda se desplaza a una longitud de onda mayor, hasta los 550 nm, aproximadamente (Figura 2). Por lo que, la absorción y el esparcimiento óptico de las AuNPs dependen en gran medida del tamaño y forma de las nanopartículas. Los plasmones de superficie de las nanopartículas metálicas están estrechamente relacionados a las propiedades SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy, por sus siglas en inglés). Las propiedades SERS son útiles para amplificar algunos fenómenos ópticos, por ejemplo: el esparcimiento Raman (Cruz et al., 2011). Por lo que, se ha reportado que las AuNPs pueden potencialmente ser aplicadas en SERS, debido a la presencia de su plasmón de superficie (Kottmann et al., 2000; Das et al., 2012).

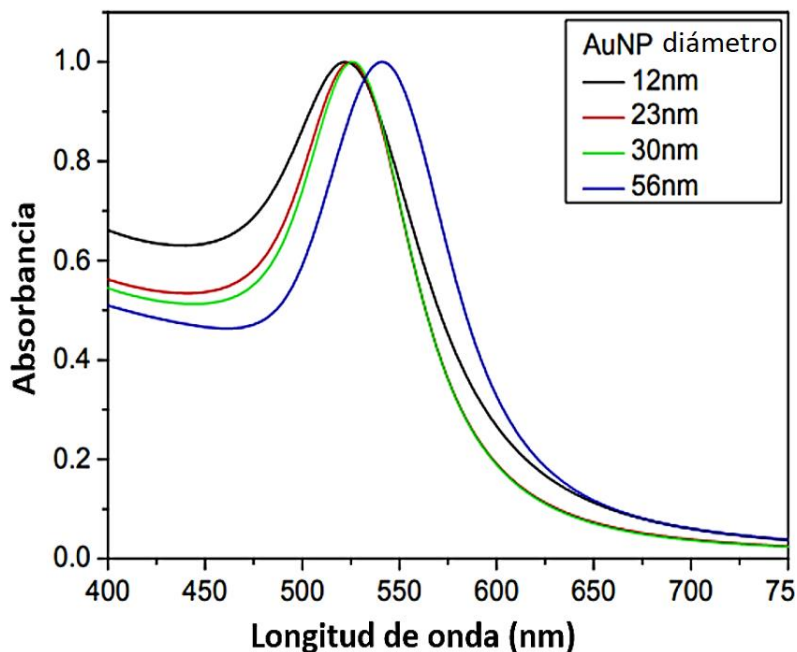


Figura 2. Representación gráfica del plasmón de superficie localizado en AuNPs esféricas con diferentes tamaños (Minutella et al., 2017).

1.3 Esparcimiento Raman

Se conoce como esparcimiento Raman al fenómeno descubierto por C.V. Raman y K.S Krishnan en 1928; quienes descubrieron que la incidencia de un haz de luz monocromática sobre una muestra induce vibraciones y rotaciones moleculares de las moléculas que componen la muestra. Por lo tanto, el resultado de la interacción entre la luz y la materia genera frecuencias distintas entre los fotones esparcidos por la muestra y el fotón de la luz incidente. Los tipos de esparcimiento Raman que existen son: el esparcimiento Raman Anti-Stokes y el esparcimiento Raman Stokes. En el esparcimiento Raman Anti-Stokes el fotón esparcido tiene una frecuencia (energía) mayor a la frecuencia (energía) del fotón incidente. Por el contrario, en el esparcimiento Raman Stokes se observa que los fotones esparcidos por la muestra presentan una frecuencia (energía) menor que la frecuencia (energía) de los fotones de la luz incidente (Rivera et al., 2015).

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución espectral que provee información en poco tiempo de la composición química y la estructura molecular de algunos compuestos orgánicos e inorgánicos. Esta técnica se basa en el esparcimiento Raman de las moléculas, lo que da lugar a un espectro Raman característico. El espectro Raman está definido por una serie de picos de intensidad en frecuencias específicas que proporcionan información sobre la estructura molecular y composición química de la

muestra (Rivera et al., 2015). La espectroscopía Raman permite obtener información química de diferentes muestras biológicas que permiten identificar macromoléculas (proteínas, ADN y lípidos) y la detección y seguimiento de algunas enfermedades como el cáncer mediante pruebas de ADN y la identificación de genes (Rivera et al., 2015). Sin embargo, existen dos limitaciones importantes en la espectroscopía Raman que impiden obtener un espectro Raman de calidad. Por un lado, no se tiene una detección eficiente de muestras con bajas concentraciones del analito ya que en este caso la cantidad de fotones esparcidos por la muestra es muy reducida y en consecuencia no se logra obtener un espectro bien definido. Para poder obtener una mejor calidad del espectro Raman, la muestra debe ser sometida a un mayor tiempo de exposición láser, por lo que se corre el riesgo de que la muestra sea dañada. Por otro lado, en los casos donde la muestra presenta fluorescencia esto puede apantallar los picos en los espectros Raman, dificultando la identificación de la composición química y estructura del compuesto (Rivera et al., 2015).

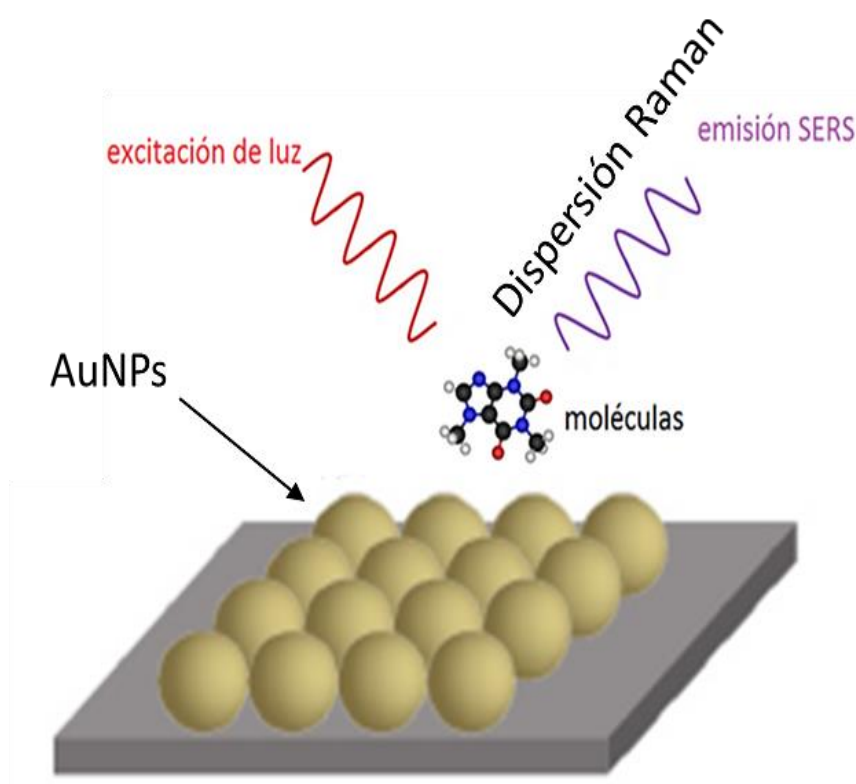


Figura 3. Representación gráfica del mecanismo SERS (Zhong, 2009).

SERS es un método que utiliza el reforzamiento del campo electromagnético de la luz incidente, a través del plasmón de superficie intensificar el esparcimiento Raman y de esta manera mejorar los espectros Raman de las moléculas bajo estudio. Las moléculas interactúan con superficies metálicas rugosas o con nanoestructuras (ej. nanopartículas de oro y plata) depositadas sobre un sustrato. El contacto entre las

moléculas y las superficies plasmónicas ocasiona el efecto SERS, produciendo un aumento en el esparcimiento Raman de las moléculas objetivo (Figura 3) (Zhong., 2009).

1.4 Aplicación de las AuNPs en Biomedicina

Debido a las limitaciones de la espectroscopía Raman, recientemente la técnica SERS ha adquirido relevancia en la identificación de biomoléculas y algunas células cancerígenas (Rivera et al., 2015). La mejora de la técnica SERS podría ser de gran relevancia en el área clínica, por ejemplo, en el diagnóstico de cáncer. El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. Entre los tipos más comunes son: cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de piel y cáncer gástrico. Por lo tanto, el desarrollo y la mejora de técnicas de alta sensibilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad podría evitar entre el 30% y el 50% de los cánceres, según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). A partir del 2007 se han desarrollado nanomateriales; entre ellos: coloides de oro y plata, así como nanoplacas de oro, que aumentan la sensibilidad del análisis basado en SERS en el diagnóstico de células cancerígenas, donde se utilizan fluidos corporales (sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.). Los nanomateriales utilizados hasta el momento han presentado entre el 70% y 90% de sensibilidad en el análisis de los picos anormales del espectro obtenido de los fluidos corporales (Zhang et al., 2019). Aunque se ha visto que SERS presenta resultados prometedores en la sensibilidad del análisis de algunas células cancerígenas, aún no se ha aplicado con éxito en el área clínica. La búsqueda de nanomateriales que sean útiles como sustratos SERS presentan relevancia, no sólo en la detección de células cancerígenas, sino también en el desarrollo de métodos novedosos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, por ejemplo, la presencia de la proteína de espiga del SARS-CoV-2. Estas técnicas de diagnóstico basadas en SERS y el uso de nanopartículas metálicas tienen potencial como herramientas en la identificación de enfermedades, lo cual resulta vital para tomar las medidas adecuadas en el tratamiento de pacientes (Zhang et al., 2021).

Recientemente se ha reportado que las nanopartículas de oro pueden ser potenciales sustratos SERS para la identificación de células cancerígenas y biomoléculas presentes en fluidos corporales. Un estudio reportó que nanopartículas de oro sintetizadas por un método químico aumentaron la intensidad de los espectros Raman de una muestra de suero sanguíneo (Rivera et al., 2015). Otro reporte logró diferenciar mediante un análisis SERS, muestras de saliva de pacientes normales y pacientes con cáncer oral, donde se utilizaron como sustrato SERS, películas de nanopartículas de oro sintetizadas por un método químico, lo que demostró el potencial de las AuNPs para ser utilizadas en SERS para el diagnóstico temprano del

cáncer oral. Cuando las nanopartículas de oro forman un arreglo bidimensional, semejante a la forma de una película delgada, también pueden presentar el plasmón de superficie, lo cual se puede utilizar para mejorar la sensibilidad del análisis Raman (Kah et al., 2007). Por lo tanto, la sensibilidad de las nanopartículas de oro en combinación con la especificidad estructural de la espectroscopía Raman convencional permite un incremento en la intensidad de los espectros, ya que las propiedades plasmónicas de las nanopartículas de oro generan el reforzamiento de la luz esparcida, favoreciendo el incremento en la intensidad de la señal Raman (Zhang et al., 2019).

A partir del conocimiento que se tiene hasta el momento de las propiedades SERS que presentan las nanopartículas de oro y los beneficios de utilizar métodos de síntesis biológicos que resultan ser amigables con el medio ambiente, en este proyecto se propone evaluar la capacidad de las AuNPs sintetizadas mediante diferentes hongos filamentosos para mejorar la señal Raman de moléculas modelo.

1.5 Antecedentes

1.5.1 Síntesis de AuNPs mediante el uso de los hongos

Los hongos han sido reportados como agentes reductores para la síntesis de AuNPs, entre los cuales se incluyen: *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Colletotrichum* sp. y *Phanerochaete chrysosporium*, entre otros (Mishra et al., 2014). Sin embargo, para aplicación SERS, es necesario que se utilicen AuNPs de formas variadas para evaluar su potencial. Diferentes especies de *Trichoderma* han sintetizado AuNPs con una diversidad de formas y tamaños. El hongo *Trichoderma hamatum*, se utilizó para la biosíntesis de AuNPs y se observó que hubo una producción de nanopartículas de oro con tamaños de 5 a 30 nm con morfologías esféricas, pentagonales y hexagonales (Abdel et al., 2018). Utilizando a *Trichoderma atroviride* se encontró que aproximadamente el 60% de las nanopartículas de oro sintetizadas fueron en forma de nanoplacas de oro triangulares con un tamaño de 50 a 75 nm. Mientras que las demás nanopartículas tuvieron forma esférica con tamaños entre 10 y 50 nm (Ponmurugan, 2016). Con el uso de *Trichoderma asperellum* se sintetizaron AuNPs cuasiesféricas y triangulares, donde más del 60% de partículas presentan un tamaño menor a 15 nm (Mukherjee et al., 2012).

Otros hongos filamentosos que han reportado una amplia variedad de formas y tamaños en la biosíntesis de las nanopartículas de oro incluyen: el hongo *Botrytis cinerea* utilizado para la síntesis de AuNPs como un método rápido y amigable con el medio ambiente. *B. cinerea* presentó AuNPs triangulares, hexagonales, esféricas, decaédricas y en formas de pirámide con tamaños aproximadamente de 1 a 100 nm (Castro et al., 2014). De igual manera, se reportó una metodología útil para la obtención de AuNPs con una variedad de formas y tamaños, donde se utilizó el filtrado de cultivo (sobrenadante) de *Alternaria alternata* para la síntesis AuNPs de forma triangular, esféricas y hexagonal con tamaños de 2 a 30 nm con un diámetro promedio de 12 nm (Sarkar et al., 2011).

1.5.2 Síntesis biológica de AuNPs utilizadas para efecto SERS

Las nanopartículas de oro sintetizadas por diferentes métodos ya han sido utilizadas para aplicación en SERS, por ejemplo, las nanopartículas de oro coloidales de 60 nm de diámetro, sintetizadas por métodos químicos han presentado un incremento de intensidad en los espectros Raman de una muestra de suero sanguíneo (Rivera et al., 2015). Otro estudio mostró nanopartículas de oro coloidal de 10 a 20 nm que permitieron detectar el espectro Raman de la zeolita natural chabasita. La chabasita es un mineral que no es posible detectar mediante espectroscopía Raman convencional (Hurtado et al., 2016). Por otro lado, se reportó que las AuNPs sintetizadas con forma esférica, por un método químico, pueden mejorar la intensidad en los espectros Raman de la glicoproteína avidina. Se reportó que nanopartículas de diferentes formas (hexagonales y otras formas irregulares) permitían un mayor incremento en la intensidad del espectro Raman. Por lo tanto, la sensibilidad otorgada por las AuNPs de una sola forma (esférica), puede ser suficiente pero no óptima para la detección de biomoléculas en SERS (Hu et al., 2007). De igual forma, se han reportado las propiedades SERS de AuNPs sintetizadas por métodos biológicos. Zhang et al., (2011) reportaron el uso de cloroplastos para producir AuNPs con forma esférica y diámetro de 20 nm. En este estudio se observó que las AuNPs sintetizadas por vía biológica mejoran con un factor de 100 la intensidad del espectro Raman del compuesto orgánico, Rodamina 6G.

Otro estudio más reciente realizado por Ávila et al., (2020), reportó AuNPs triangulares sintetizadas mediante el extracto de la planta *Anemopsis californica* amplificaron 3.77 veces el esparcimiento Raman del azul de metileno (MB). Sin embargo, hasta ahora solo existe un estudio del uso de las AuNPs sintetizadas por un hongo filamentosos con aplicación en SERS (Quester et al., 2013).

Las AuNPs sintetizadas mediante hongos filamentosos mencionados anteriormente han presentado su potencial en diferentes aplicaciones. Sin embargo, el único reporte hasta el momento de AuNPs sintetizadas mediante el extracto de hongos filamentosos con aplicación en SERS ha sido publicado por Quester et al., (2013), donde se demostró que las nanopartículas de oro sintetizadas con el extracto de *N. crassa* aumentó la intensidad del espectro Raman del azul de metileno. En este estudio se observó que para AuNPs de forma cuasiesféricas, con tamaños entre 3 a 12 nm, se duplica la intensidad del espectro. Al utilizar tamaños entre 6 a 23 nm de formas cuasiesféricas y algunas formas diferentes (principalmente triangulares) se consigue un factor de 15 en el aumento en la señal Raman. Mientras que AuNPs con una amplia distribución de tamaños (10 a 200 nm) y una amplia variedad de formas (esféricas, hexagonales y triangulares) se logra un incremento de hasta 40 veces en la intensidad del espectro Raman. Esto demostró que a una longitud de onda incidente de 632.8 nm, las AuNPs de diferentes formas y amplio intervalo de tamaños, sintetizadas mediante hongos filamentosos, presentan la capacidad de aumentar la intensidad del esparcimiento Raman, demostrando que las AuNPs sintetizadas por hongos presentan propiedades SERS. Por lo tanto, estas NPs pueden ser aplicadas para mejorar la señal Raman de moléculas de interés.

En el estudio de Ávila et al., (2022) se observó que al utilizar una longitud de onda incidente de 632 nm, nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas utilizando el extracto de *Amenopsis californica* con una variedad de formas (flores, icosaedros y varillas) presentan un mayor incremento en la intensidad del espectro SERS del azul de metileno, incrementando hasta 23.19 veces la intensidad del espectro, esto en comparación con las AgNPs con una mayor distribución de formas esféricas las cuales permitieron un aumento en la intensidad del espectro de hasta 3.49 veces (Figura 4). Por el contrario, en el mismo estudio se observó que al utilizar una longitud de onda de 532 nm, las AgNPs de forma esférica presentan una mayor capacidad de incrementar el efecto SERS del azul de metileno hasta 7.47 veces, en comparación con aquellas que presentan una variedad de formas y tamaños, donde se consigue un incremento de 2.38 veces en la intensidad del espectro.

Cabe destacar que hasta el momento no se conoce del todo el mecanismo exacto que proporciona las propiedades SERS de las AuNPs. Estudios recientes han reportado que la respuesta SERS de las nanopartículas metálicas depende en gran medida de la forma, tamaño y cristalinidad, así como de la longitud de onda incidente con la que se excita a las NPs (Ávila et al., 2022).

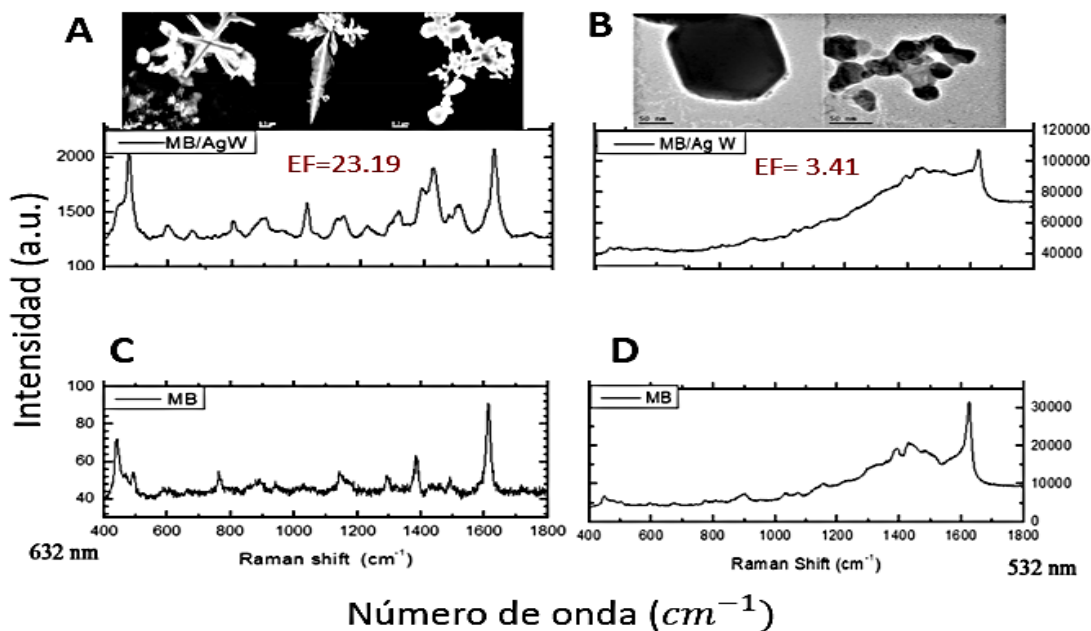


Figura 4. Representación gráfica de la eficacia de las AgNPs de aumentar la intensidad del espectro SERS del azul de metileno (MB). Imágenes TEM de AuNPs sintetizadas utilizando el extracto de *Amenopsis californica* y espectro SERS de MB+AgNPs con variedad de formas y tamaños a una longitud de onda de 632 nm (A). Imágenes TEM de AuNPs sintetizadas utilizando el extracto de *Amenopsis californica* y espectro SERS de MB+AgNPs con morfología esférica y tamaños menores entre 21 a 27 nm con una longitud de onda incidente de 532 nm (B). Espectro Raman del MB (C y D) excitado a diferentes longitudes de onda. Tomado y modificado de Ávila et al., (2022).

1.6 Justificación

La técnica SERS ha adquirido relevancia en la identificación de biomoléculas y algunas células cancerígenas, ya que se han presentado resultados prometedores. En este contexto se ha demostrado la utilidad de las nanopartículas de oro para mejorar la sensibilidad en la detección de estos especímenes por espectroscopia Raman. Es por ello que se propone la síntesis de nanopartículas de oro utilizando un método eco-amigable mediante el empleo de hongos filamentosos. La evaluación de las propiedades SERS de las nanopartículas de oro sintetizadas mediante diferentes hongos filamentosos permitirá expandir el conocimiento sobre las propiedades que presentan las nanopartículas de oro sintetizadas por estos microorganismos y su posible aplicación en SERS.

1.7 Hipótesis

Las nanopartículas de oro sintetizadas por diferentes hongos filamentosos mejoran selectivamente la intensidad del espectro Raman.

1.8 Objetivos

1.8.2 Objetivo general

Determinar la capacidad de nanopartículas de oro sintetizadas mediante hongos filamentosos para mejorar la medición del espectro Raman de especímenes de interés.

1.8.3 Objetivos específicos

1. Determinar protocolos de síntesis para AuNPs utilizando diferentes especies de hongos filamentosos.
2. Identificar el espectro de resonancia plasmónica superficial de las AuNPs obtenidas.
3. Determinar la morfología y tamaño de las AuNPs.
4. Determinar el potencial z y el diámetro hidrodinámico de las AuNPs.
5. Evaluar la capacidad de las AuNPs para mejorar el espectro Raman.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas de hongos y medios de cultivo

Las cepas de hongos filamentosos que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron del cepario del laboratorio de Microbiología del CICESE. Se trabajó con los hongos, *Alternaria alternata*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Botrytis cinerea* y *Ganoderma sessile*. Para cultivar las cepas fúngicas, se utilizó el medio de cultivo sólido agar - de papa dextrosa (PDA) y el medio líquido, papa-dextrosa (PDB).

2.2 Obtención de sobrenadante

Para la biosíntesis de las nanopartículas de oro, se utilizó el sobrenadante de los hongos filamentosos. Las cepas de los hongos se cultivaron a la temperatura reportada para cada especie y durante un intervalo de tiempo diferente hasta obtener aproximadamente 10 gramos de biomasa.

Primeramente, las cepas de *Trichoderma* y *A. alternata*, se inocularon en cajas Petri de 100 mm x 15 mm con medio agar papa dextrosa (PDA), por triplicado y se incubaron a 30°C por 96 h. El hongo *B. cinerea* se incubó a 25 °C durante 7 días. Posteriormente, se agregaron 10 ml de agua destilada para obtener una suspensión cargada de esporas frescas. Se utilizaron 100 µl de la suspensión de esporas de cada hongo (*A. alternata*, *B. cinerea* y ambas cepas de *Trichoderma*) a una concentración 1×10^6 esporas/ml y se añadieron en matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio caldo papa dextrosa (PDB). Después los medios se colocaron en incubadora con agitación a 120 rpm. *A. alternata* se incubó a 28 °C durante 10 días. *B. cinerea* se incubó a 25 °C durante 11 días. Los hongos filamentosos, *T. atroviride* y *T. asperellum* se incubaron a 30 °C durante 3 días. Una vez transcurridos los días de incubación en agitación, se tomó la biomasa de cada medio líquido utilizando un filtro de tela tipo magitel estéril y se pesó.

La cepa de *G. sessile* se inoculó en cajas Petri con 10 ml de medio agar papa dextrosa, por triplicado. Posteriormente, se incubó a 30 °C por 96 h. Una vez que el micelio llenó $\frac{3}{4}$ de la caja de cultivo, se obtuvieron 10 muestras del micelio en medio de cultivo de cada caja Petri, con un tamaño estándar de 10 mm de diámetro. Las muestras del micelio se trasladaron a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio caldo papa dextrosa (PDB) cada uno, y se colocaron en incubadora con agitación a 120 rpm por 7 días a 30 °C.

Una vez que se observó suficiente crecimiento (aprox. 10 g) de cada uno de los hongos en el medio de cultivo líquido, se obtuvo el sobrenadante. Para ello, el líquido del medio se decantó y se filtró por tela tipo magitel estéril seguido de una segunda filtración con un filtro de 25 mm con membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm (MF-Millipore). Finalmente, se almacenaron los sobrenadantes obtenidos de cada uno de los hongos en frascos estériles a temperatura ambiente en oscuridad.

Posteriormente se obtuvo el sobrenadante de las mismas especies de hongos mediante un método diferente. En este caso, para obtener el sobrenadante purificado, una vez que se observó crecimiento en medio líquido de cada uno de los hongos, se separó la biomasa del medio líquido. Posteriormente, la biomasa se lavó con agua destilada y se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua desionizada y se incubó en agitación a 120 rpm por 72 h a 30 °C. Transcurridas las 72 h se obtuvo el sobrenadante por filtración y se colocó en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 22 °C. Se decantó el sobrenadante y se filtró en bomba de vacío con membrana de nitrocelulosa 0.45 μm , posteriormente fue colocado en jeringa de 20 ml y se filtró utilizando un filtro de 25 mm con membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm (MF-Millipore). Finalmente, el sobrenadante de cada uno de los hongos se almacenó en frasco estéril a temperatura ambiente en oscuridad.

2.3 Síntesis de nanopartículas de oro por vía biológica

Como precursor metálico, se utilizó el ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), en una solución a 1 mM. El sobrenadante de cada hongo (*A. alternata*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *B. cinerea* y *G. sessile*) se colocó en la solución de HAuCl_4 a 1 mM en la siguiente proporción; 1:3 (sobrenadante: HAuCl_4), de acuerdo a Quester et al (2013).

Con el objetivo de obtener AuNPs con una variedad de formas y tamaños, la síntesis se llevó a cabo a diferentes temperaturas (ambiente y 60 °C) y valores de pH. Se utilizó pH 3 (sin modificar) para la síntesis de AuNPs utilizando el sobrenadante de *A. alternata* y *B. cinerea*. La síntesis de AuNPs mediante *T. atroviride* y *T. asperellum* se llevó a cabo utilizando pH 7. Posteriormente se realizó la síntesis de las AuNPs utilizando el sobrenadante purificado de los hongos *A. alternata*, *T. atroviride*, *B. cinerea*, *G. sessile* y *T. asperellum* a 60 °C y pH 10. Para ajustar el pH, se agregó hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 0.5 mM a la solución (sobrenadante: HAuCl_4). Las diferentes reacciones se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y se observaron a las 24, 48, 72 y 96 h.

2.4 Caracterización de las nanopartículas

2.4.1 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Visible)

Se observó la formación de las AuNPs mediante un cambio de color de la solución, de incoloro a púrpura. Posteriormente, se determinó la reducción del ácido tetracloroáurico en el análisis espectral mediante la aparición de la banda de resonancia de plasmón superficial característico de las AuNPs. Para ello se realizó una dilución de cada muestra de AuNPs. Se agregaron 100 μ l de la solución de AuNPs en 1 ml de agua desionizada. Se utilizó un espectro de absorción entre 400 a 700 nm. Finalmente, se observó el pico de absorbancia característico de las AuNPs, entre 530 a 540 nm, aproximadamente.

2.4.2 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z

El análisis de la carga y la distribución de tamaños de las AuNPs se llevó a cabo mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), utilizando un sistema Zetasizer. Se colocó la dilución de interés en celdas especiales para Zetasizer Nano. Para comprobar la calidad de la medición, cada muestra se analizó 3 veces a 25 °C.

2.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El análisis del tamaño y la morfología de las AuNPs sintetizadas por las diferentes especies de hongos filamentosos, se llevó a cabo utilizando el microscopio electrónico de transmisión, Hitachi H-7500, operado a 80 kV. De cada muestra se tomaron 10 μ l y se colocaron en rejillas de cobre de 75 de malla y recubiertas de formvar/carbón, se secaron al ambiente y se guardaron en porta-muestras para su análisis posterior. Los tamaños de las partículas se determinaron mediante el software Image J. Se midieron de 300 a 700 partículas por cada muestra.

2.4.4 Evaluación SERS de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos

Para la evaluación SERS, se tomaron 60 μ l de la solución sobrenadante-AuNPs obtenido por cada hongo y se colocaron en portaobjetos de vidrio; posteriormente se secaron al ambiente durante 12 hrs. Se utilizó

el sobrenadante sin NPs de cada uno de los hongos como control negativo. Las muestras fueron calcinadas a 400 °C durante 4 horas para eliminar el material orgánico de la superficie de las AuNPs proveniente del sobrenadante fúngico. Posteriormente se colocaron 20 µl de una solución de azul de metileno (MB) al 0.01% en cada portaobjetos conteniendo las AuNPs libres de materia orgánica y se secaron durante 1 min. Los espectros Raman se obtuvieron con un sistema microRaman (Lambda Solutions) del Departamento de Óptica del CICESE. Se utilizó un láser de Nd:YAG ($\lambda=532$ nm) para excitar las muestras con una intensidad de 0.7 mW. Se utilizó un arreglo lineal CCD como detector. El tiempo de adquisición de datos fue de 3 segundos con 20 adquisiciones. Se utilizaron los mismos parámetros experimentales para todas las muestras.

2.5 Ecuación SERS

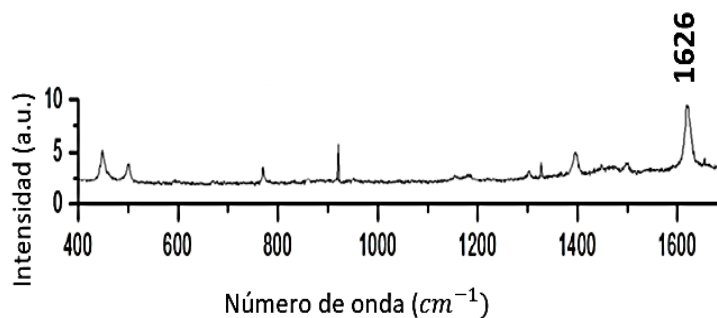


Figura 5. Espectro Raman del MB (Quester et al., 2013).

Para determinar la eficacia de la AuNPs en el efecto SERS del azul de metileno se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de mejora}(EF) = \frac{I_{SERS}}{I_R} \quad (1)$$

Donde:

I_{SERS} = Intensidad de la señal Raman utilizando AuNPs

I_R = Intensidad de la señal Raman del azul de metileno

Para ello se tomó en cuenta el incremento de la intensidad SERS para el pico Raman localizado en la posición 1626 cm^{-1} del azul de metileno, caracterizado por Quester et al., (2013) (Figura 5). Entre mayor

es el factor de mejora, mayor es el efecto de las AuNPs sobre el incremento en el esparcimiento Raman de la molécula de estudio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción de nanopartículas de oro mediante hongos filamentosos

Para explorar y entender el proceso de reducción de iones metálicos en la solución hongo-metal precursor, se tomó en cuenta la cantidad de biomasa producida por cada hongo después de haber sido incubado en medio PDB. La cantidad de biomasa formada por el hongo *A. alternata* fue de 6 gramos, la cual presentó coloración marrón después de un periodo de incubación de 10 días a 28 °C. Las especies de *Trichoderma*, después de un periodo de incubación en agitación de 3 días a 30 °C presentaron suficiente cantidad de biomasa. *T. atroviride* produjo 14.7 gramos de biomasa en forma de esferas pequeñas y color verde. El hongo *T. asperellum* produjo 17 gramos de biomasa con pigmentación amarilla. La biomasa obtenida por el hongo *B. cinerea* produjo 10 gramos de biomasa en un periodo de incubación de 12 días a 25 °C. El hongo *G. sessile* produjo 11 gramos de biomasa en un periodo de incubación de 7 días a 30 °C.

La Figura 6 muestra la producción de AuNPs a temperatura ambiente que se llevó a cabo utilizando diferentes parámetros de pH para cada una de las especies de hongos.

Los hongos *A. alternata* y *B. cinerea* llevaron a cabo la síntesis de AuNPs a pH 3. El hongo *T. atroviride* y *T. asperellum* sintetizaron AuNPs a pH 7. Por último, el hongo *G. sessile* llevó a cabo la síntesis de AuNPs a pH 10. El cambio de color amarillo a violeta de la solución hongo-metal precursor indicó la reducción del metal precursor mediante los metabolitos secundarios provenientes del sobrenadante directo del medio obtenido de cada una de las especies fúngicas.

En la figura 7 se muestra la producción de AuNPs a 60 °C que se llevó a cabo utilizando pH 10 para cada una de las especies de hongos (*A. alternata*, *B. cinerea*, *T. atroviride*, *G. sessile* y *T. asperellum*).

La presencia de AuNPs se observó con el cambio de color de la solución hongo-metal precursor indicando la reducción del metal precursor mediante los metabolitos secundarios provenientes del sobrenadante obtenido de cada una de las especies fúngicas.

Las AuNPs sintetizadas por los hongos *T. atroviride* y *G. sessile* a 60 °C presentaron un cambio de viraje de incoloro a rojo oscuro en la solución hongo-metal precursor en un periodo de 24 h.

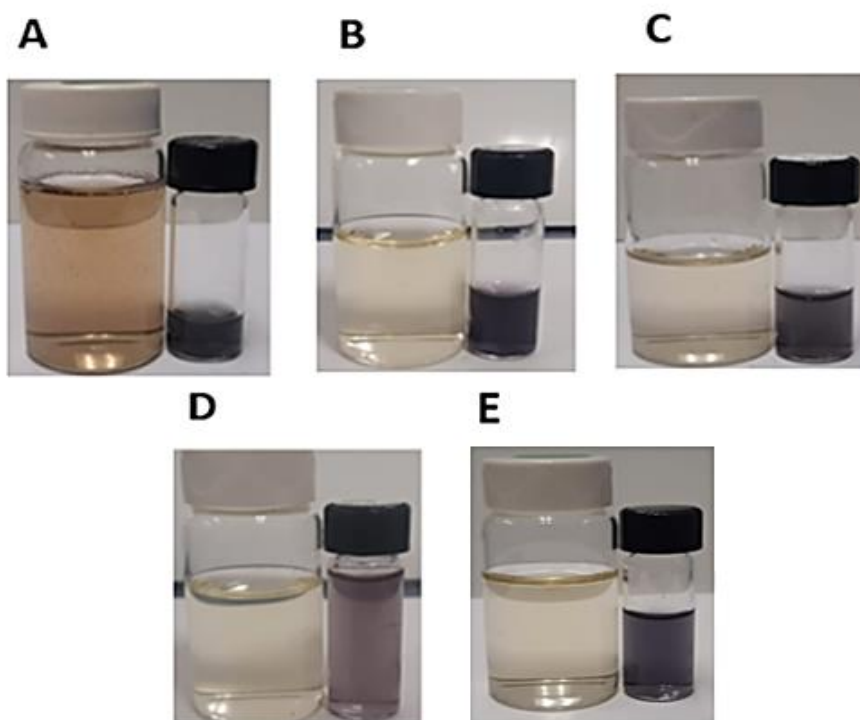


Figura 6. Nanopartículas de oro sintetizadas a temperatura ambiente utilizando el sobrenadante de los hongos filamentosos *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E) caracterizado por el cambio de color, de amarillo a púrpura en incubación durante 24 h en oscuridad.

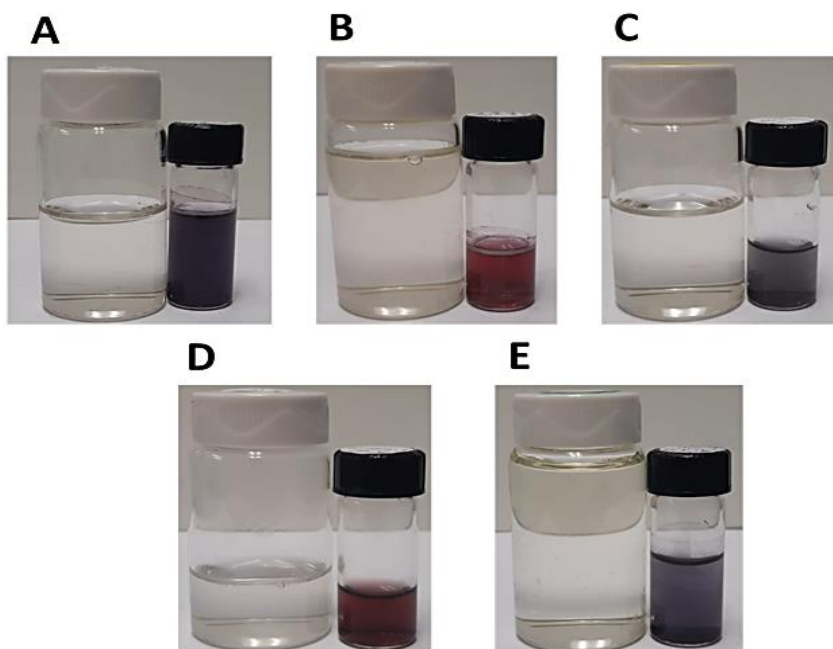


Figura 7. Nanopartículas de oro sintetizadas a 60 °C utilizando el sobrenadante de los hongos filamentosos *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E) caracterizado por el cambio de color, de amarillo claro a violeta de la solución hongo-metal precursor en incubación durante 24 h en oscuridad. En la imagen (B y D) se observa las AuNPs sintetizadas por el hongo *G. sessile* y *T. atroviride*. En ambos casos la producción de AuNPs se presentó con un cambio de viraje de incoloro a rojo oscuro en la solución hongo-metal precursor en un periodo de 24 h.

3.2 Caracterización de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos a temperatura ambiente

3.2.1 Análisis mediante espectroscopía UV-Visible

El análisis espectral de la resonancia del plasmón superficial de las AuNPs de cada muestra (Figura 8), indicó la presencia exitosa de AuNPs.

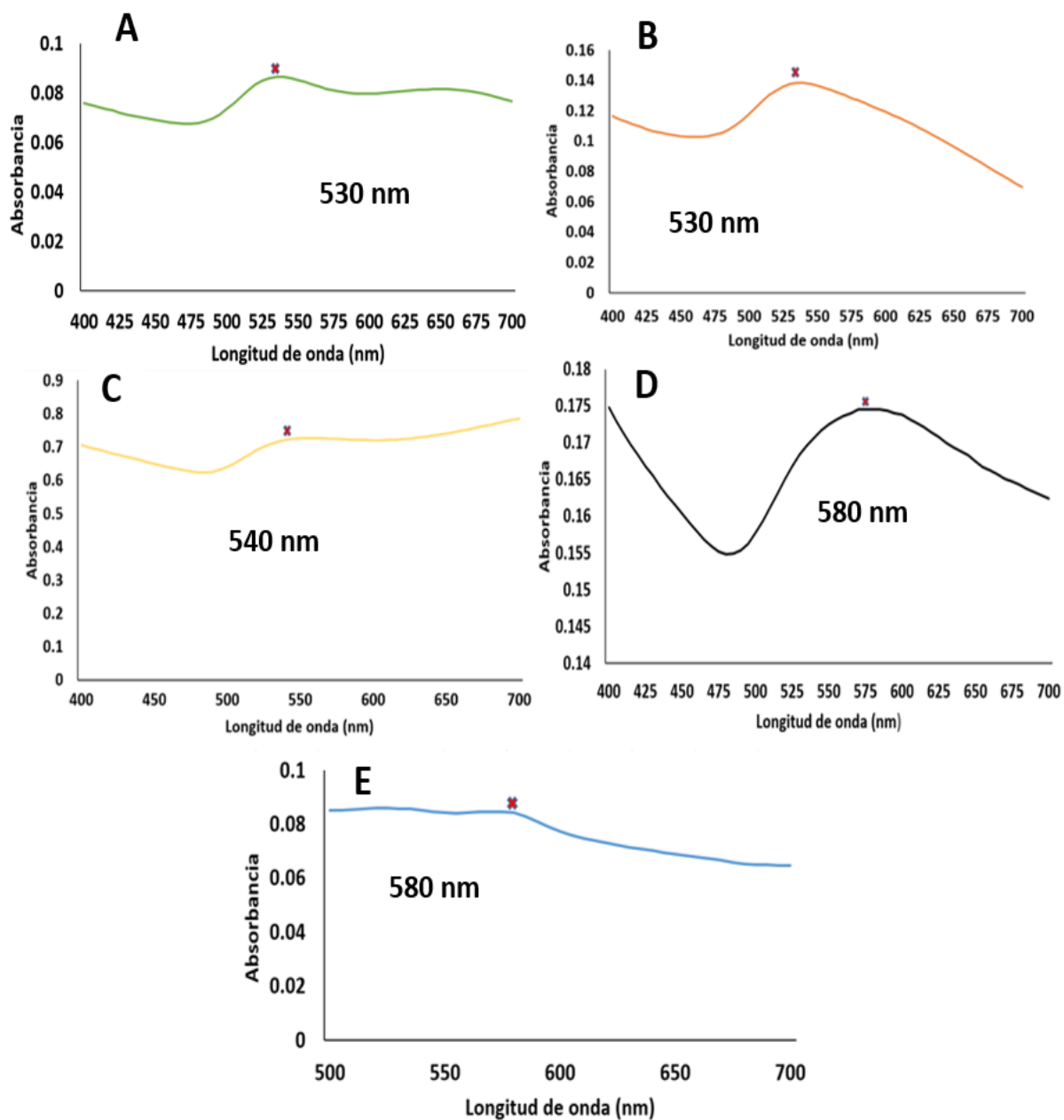


Figura 8. Representación gráfica del espectro de absorción de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos. A. *alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E).

La presencia de los diferentes plasmones de superficie localizados indicó la diversidad de tamaños de las AuNPs sintetizadas. La resonancia plasmónica superficial se desplaza a longitudes de onda mayores con relación a la forma y el tamaño de las AuNPs. Las AuNPs sintetizadas por los hongos *A. alternata* y *T. atroviride* presentaron resonancia plasmónica de superficie alrededor de los 530 nm.

La resonancia plasmónica de superficie de las AuNPs sintetizadas por los hongos *B. cinerea*, *G. sessile* y *T. asperellum* se desplaza a una longitud de onda de 540 y 580 nm, respectivamente. En el caso de las AuNPs sintetizadas por los hongos *A. alternata* y *B. cinerea* se observó la presencia de un segundo plasmón de superficie alrededor de los 660 nm y 700 nm, respectivamente, lo cual podría atribuirse a la presencia de AuNPs de forma triangular y algunas irregulares con tamaños mayores a 50 nm.

3.2.2 Análisis de distribución de tamaño de AuNPs mediante DLS

En la figura 9, se presenta la distribución de tamaños (diámetro hidrodinámico) de las NPs en cada una de las muestras de AuNPs sintetizadas, obtenido a partir de un análisis mediante dispersión de luz dinámica.

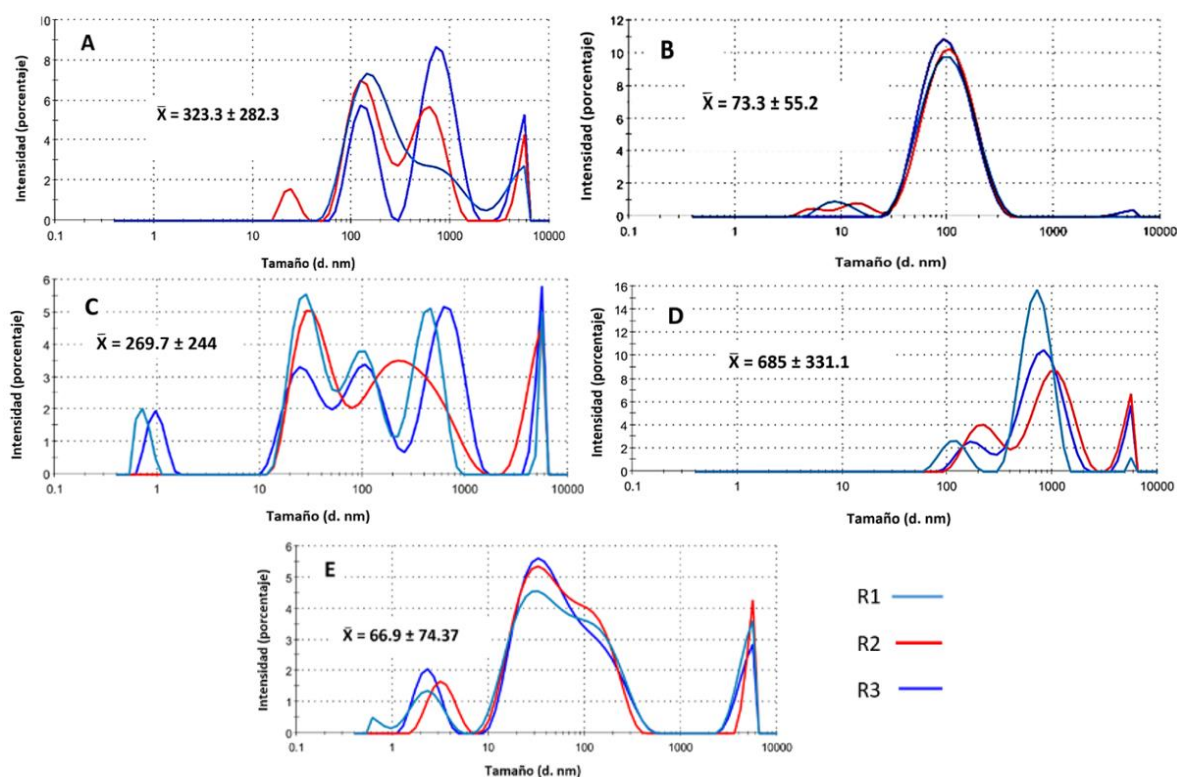


Figura 9. Representación gráfica de la distribución de diámetro hidrodinámico de las AuNPs sintetizadas por diferentes hongos. *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E). Los diferentes picos indicados con color (azul, rojo y azul claro), representan diferentes registros (R1, R2 y R3) realizados para obtener el tamaño promedio de la distribución de tamaño AuNPs.

El análisis indicó un tamaño hidrodinámico promedio de 323.3 ± 282.3 nm para las AuNPs sintetizadas utilizando el sobrenadante de *A. alternata*, 73.3 ± 55.2 nm para AuNPs formadas por el hongo *T. atroviride* y 66.9 ± 74.3 nm las AuNPs sintetizadas por *T. asperellum*. Las AuNPs sintetizadas por el hongo *B. cinerea* presentaron un tamaño de 269.7 ± 244 nm y el hongo *G. sessile* sintetizó AuNPs con un tamaño promedio de 685 ± 331.1 nm. Los diferentes picos de intensidad indican la polidispersidad de las muestras (Figuras A, C, D y E), es decir la presencia de nanopartículas con múltiples tamaños en cada muestra. En el caso de las AuNPs sintetizadas por el hongo *T. atroviride* se muestra un solo pico dominante en cada una de las mediciones, lo cual indica la monodispersidad de la muestra.

3.2.3 Potencial Z de AuNPs

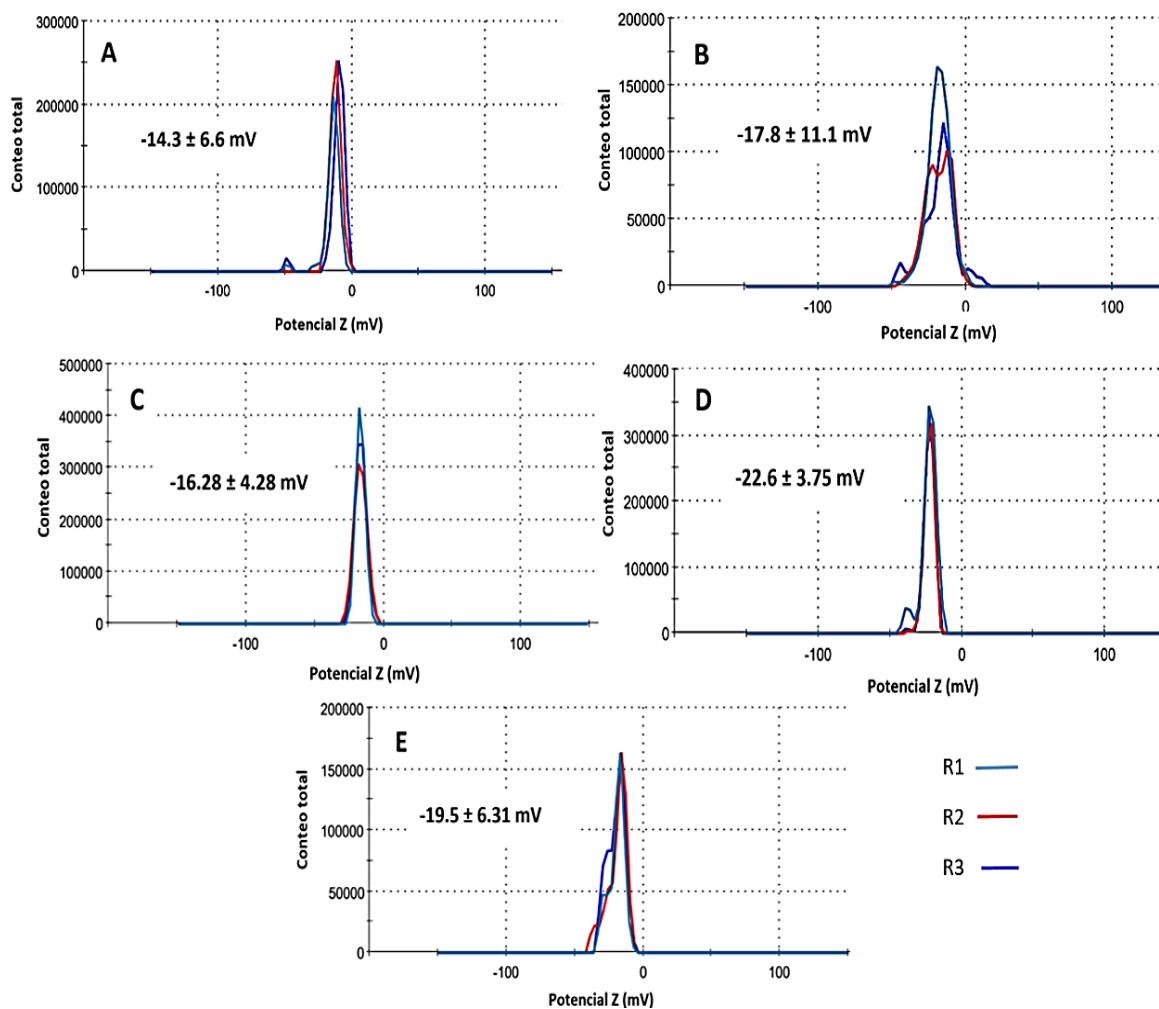


Figura 10. Representación gráfica de distribución de potencial Z de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E). Los diferentes picos indicados con color (azul, rojo y azul claro), representan los diferentes registros (R1, R2 y R3) realizados para obtener el valor promedio del potencial Z.

En el análisis del potencial Z de cada muestra (Figura 10), se observó que las AuNPs presentan un potencial Z promedio de -14.3 ± 6.6 mV (A), -17.8 ± 11.1 mV (B), -16.2 ± 4.28 mV (C), -22.6 ± 3.75 mV (D) y -19.5 ± 6.31 mV (E). El potencial Z indica la carga superficial de las AuNPs. Las nanopartículas que presentan valores mayores a -30 mV y menores a 30 mV, se consideran estables, esto quiere decir que la formación de aglomeraciones entre las nanopartículas sintetizadas por estos hongos, es muy poco probable. La estabilidad de las AuNPs posiblemente pueda deberse a la materia orgánica presente en la superficie. Los valores cercanos a -30 mV indicaron una mayor estabilidad y un menor grado de agregación de las AuNPs. La presencia de una capa de moléculas provenientes de la solución del hongo, las cuales recubren la superficie de las partículas, podría estar afectando la carga superficial de las partículas.

3.2.4 Análisis de morfología y tamaño de AuNPs mediante TEM

Las imágenes TEM mostraron que las AuNPs sintetizadas por cada especie de hongo a temperatura ambiente y diferentes pH presentaron una variedad de formas y tamaños (Figura 11-15).

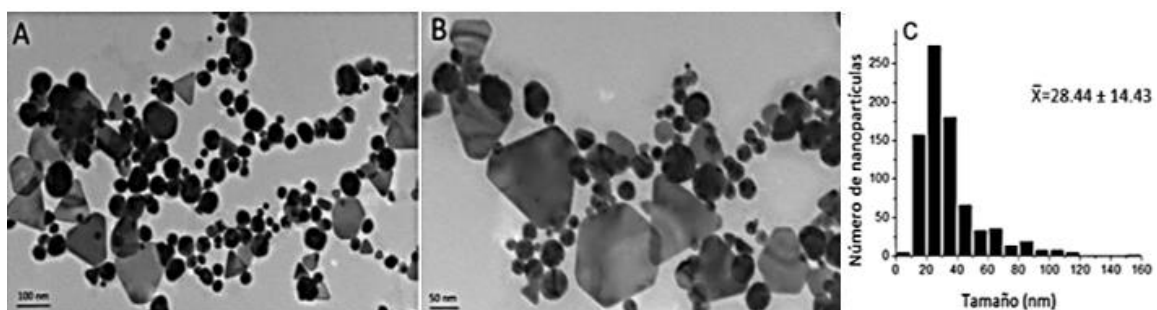


Figura 11. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso, *A. alternata*. (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

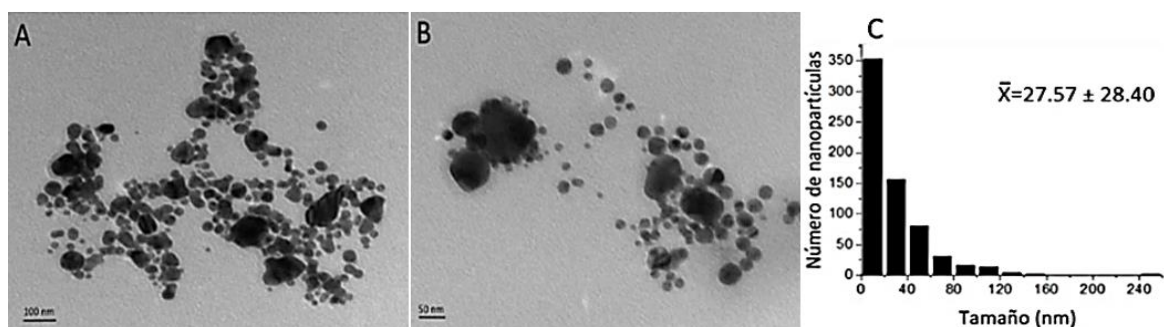


Figura 12. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *T. atroviride*. (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

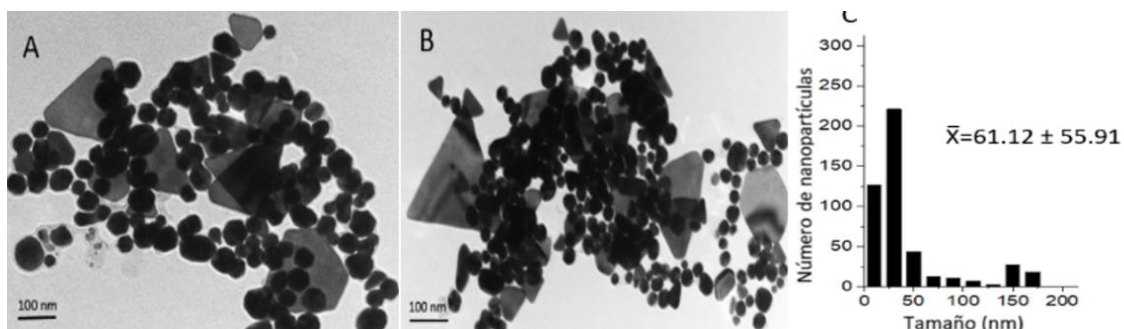


Figura 13. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *B. cinerea*. (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

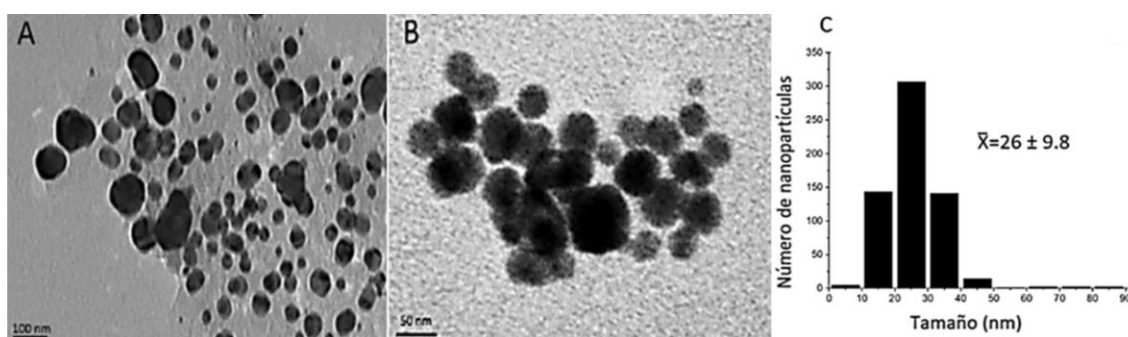


Figura 14. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo *G. sessile* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

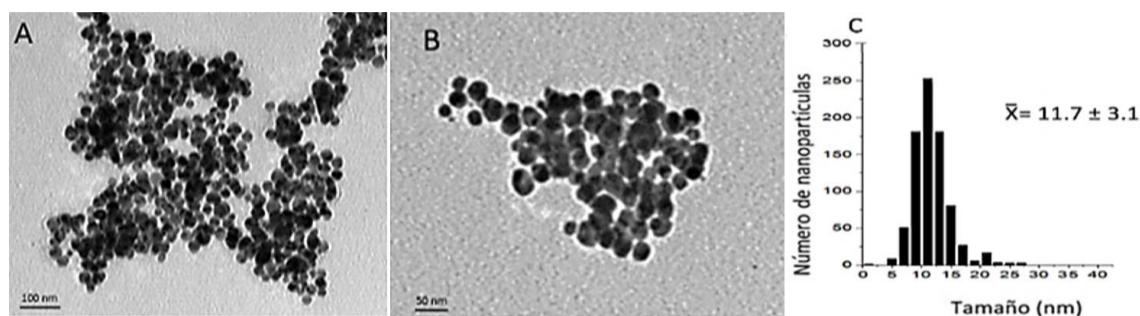


Figura 15. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *T. asperellum* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

En la figura 11 se muestra las imágenes TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante de *A. alternata* a pH 3 (sin modificar), las cuales presentaron formas cuasi-esféricas y algunas formas diferentes, principalmente triángulos, con un intervalo de tamaño principal de 20 a 40 nm y un tamaño promedio de 28.44 ± 14.43 nm. Las AuNPs sintetizadas por las especies de *Trichoderma* a pH 7 (Figura 12

y 15) y las AuNPs sintetizadas por el hongo *G. sessile* presentaron formas esféricas y cuasi-esféricas en un rango de tamaño de 5 a 100 nm (Figura 14), principalmente tamaños de 5 a 50 nm y un tamaño promedio de 27.74 ± 28.40 nm, 11.7 ± 3.1 nm y 26 ± 9.8 nm, respectivamente. Las AuNPs sintetizadas con el sobrenadante del hongo patógeno *B. cinerea* presentaron una variedad de formas, esféricas, triangulares e irregulares con tamaños desde 5 hasta 180 nm, aproximadamente (Figura 13).

3.3 Caracterización de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos a 60 °C por diferentes hongos filamentosos

3.3.1 Análisis mediante espectroscopía UV-Visible

Los espectros de absorción de las AuNPs sintetizadas a 60 °C por cada una de las especies de hongos (Figura 16), exhibieron una sola resonancia plasmónica a una longitud de onda menor a 550 nm, lo cual indicó la presencia exitosa de AuNPs, principalmente de forma esférica y semiesférica.

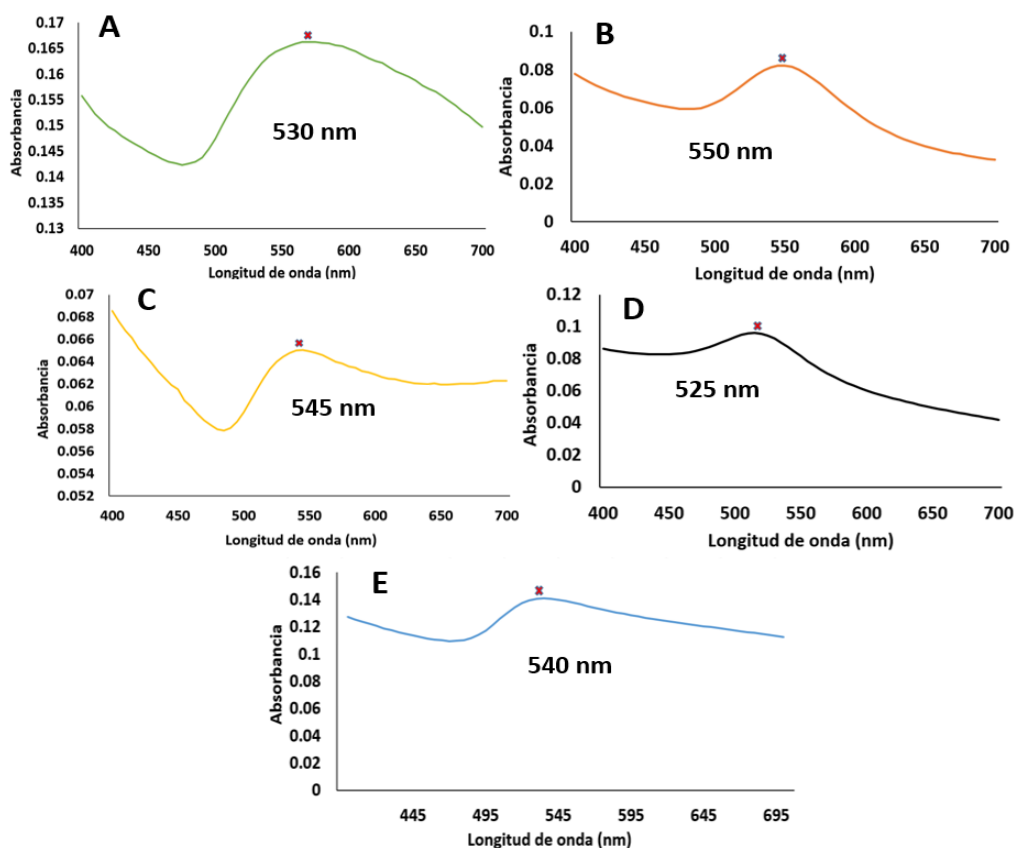


Figura 16. Representación gráfica del espectro de absorción de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos. A. *alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E).

Se localizó el plasmón de superficie de las AuNPs, sintetizadas utilizando el sobrenadante de los hongos *A. alternata* y *T. Asperellum*, a una longitud de onda de 530 nm. Las AuNPs sintetizadas por los hongos *T. atroviride* y *B. cinerea* presentaron el plasmón de superficie a los 550 y 545 nm, respectivamente. Las AuNPs sintetizadas por el hongo *G. sessile* presentaron un espectro de absorción cerca de los 525 nm.

3.3.2 Análisis de distribución de tamaño de AuNPs mediante DLS

En la figura 17, se muestra el análisis de la distribución de tamaños del diámetro hidrodinámico promedio de las AuNPs sintetizadas bajo las mismas condiciones de temperatura y pH 10 por diferentes hongos.

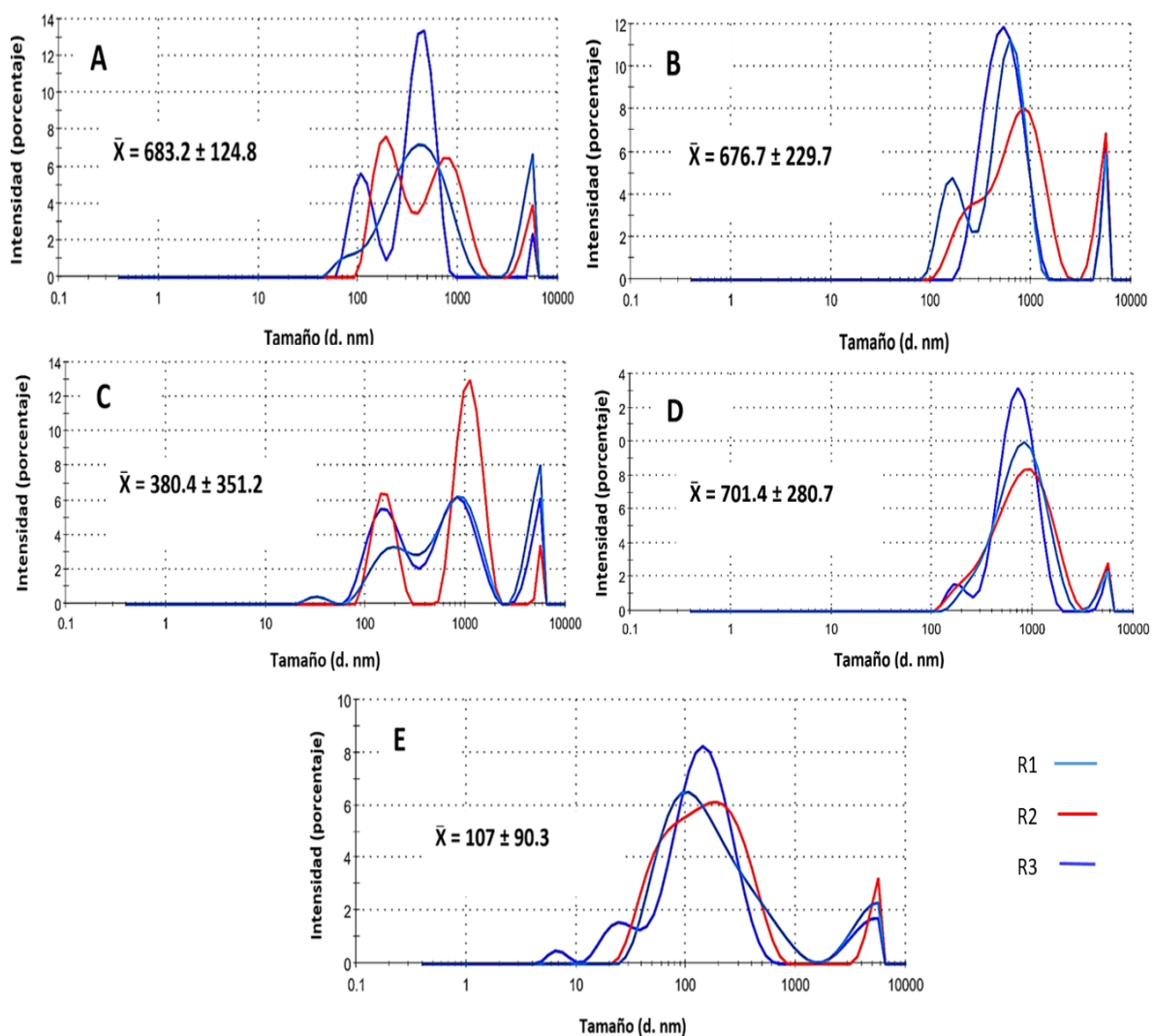


Figura 17. Representación gráfica de la distribución de tamaño de las AuNPs sintetizadas por diferentes hongos. A. *alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E). Los diferentes picos indicados con color (azul, rojo y azul claro), representan los diferentes registros (R1, R2 y R3) realizados para obtener el tamaño promedio de la distribución de tamaño AuNPs.

Las AuNPs sintetizadas por los hongos *A. alternata* presentaron tamaños promedio y una desviación estándar de nm 683 ± 124.8 nm. *T. atroviride* sintetizó AuNPs con tamaños de 683 ± 124.8 nm. El hongo *B. cinerea* sintetizó AuNPs con tamaños de 380.4 ± 351.2 nm y el hongo *G. sessile* con tamaños de 701.4 ± 280.7 nm. En el caso de las AuNPs sintetizadas con el sobrenadante del hongo *T. asperellum* el tamaño promedio fue de 107 ± 90.3 nm. Los diferentes picos que se obtuvieron indicaron la diversidad de tamaños de AuNPs sintetizadas por cada especie de hongo. En el caso de las AuNPs sintetizadas por los hongos *A. alternata* y *B. cinerea* se observó una variedad de picos con respecto a la intensidad en cada registro realizado, lo cual indicó la polidispersidad de las AuNPs sintetizadas por estos hongos.

3.3.3 Potencial Z de AuNPs

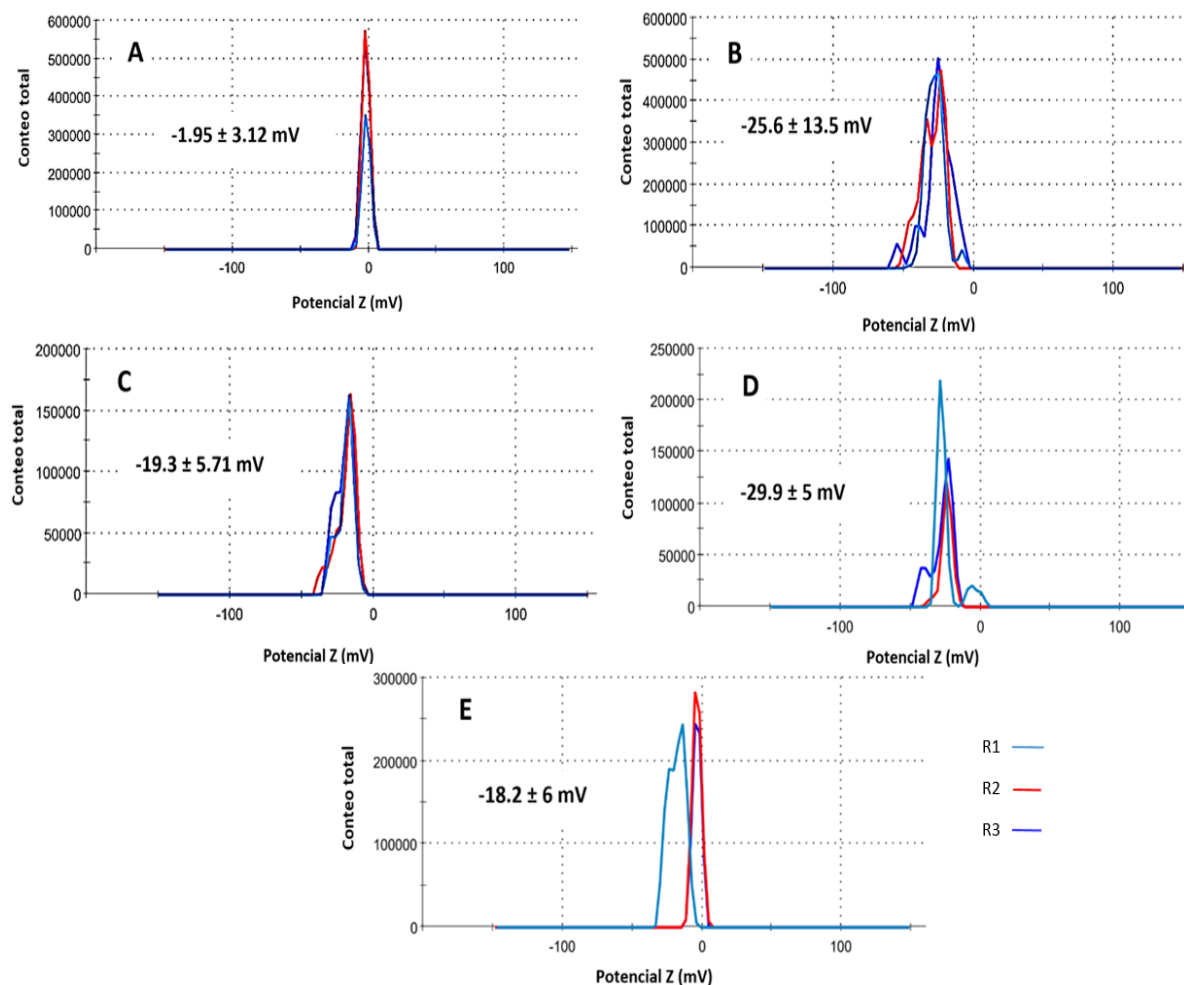


Figura 18. Representación gráfica de distribución de potencial Z de AuNPs sintetizadas por diferentes hongos filamentosos *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E). Los diferentes picos indicados con color (azul, rojo y azul claro), representan los diferentes registros (R1, R2 y R3) realizados para obtener el potencial Z promedio.

En el análisis del potencial Z de cada muestra (Figura 18), se observó que las AuNPs presentan un potencial Z promedio de -1.95 ± 3.12 mV (A), -25.6 ± 13.5 mV (B), -19.3 ± 5.71 mV (C), -29.9 ± 5 mV (D) y -18.2 ± 6 mV (E). La carga superficial de las AuNPs sintetizadas por los diferentes hongos indica el grado de agregación y la estabilidad. Los valores obtenidos podrían atribuirse a la presencia de una capa de moléculas que recubre la partícula proveniente del sobrenadante de los hongos.

3.3.4 Análisis de morfología y tamaño de AuNPs mediante TEM

Las imágenes TEM mostraron que cada una de las especies de hongo (*A. alternata*, *T. atroviride*, *B. cinerea*, *G. sessile* y *T. asperellum*) sintetizó AuNPs con morfologías esféricas y semiesféricas con una distribución de tamaños predominante entre 10 y 30 nm (Figura 19-23).

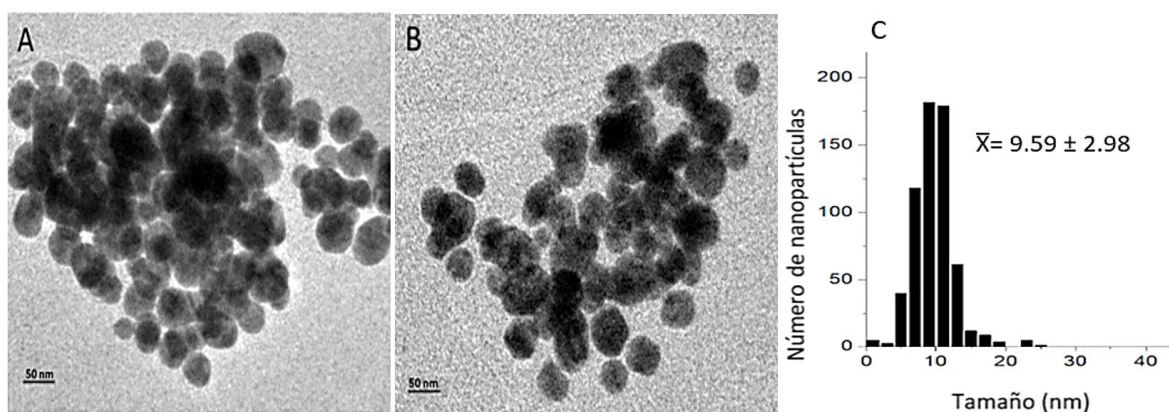


Figura 19. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *A. alternata* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

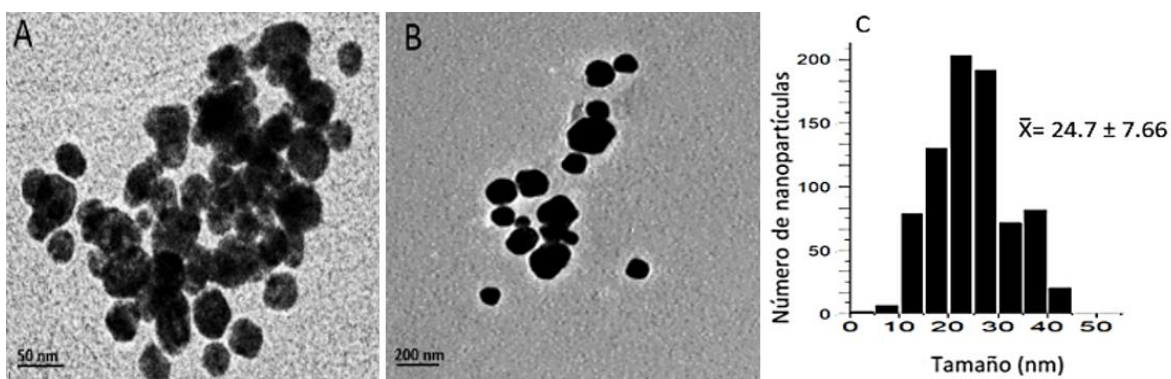


Figura 20. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *T. atroviride* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

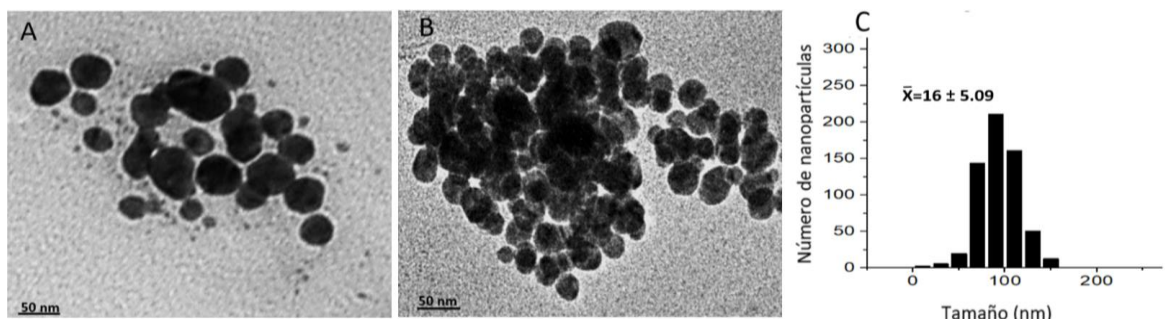


Figura 21. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *B. cinerea* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

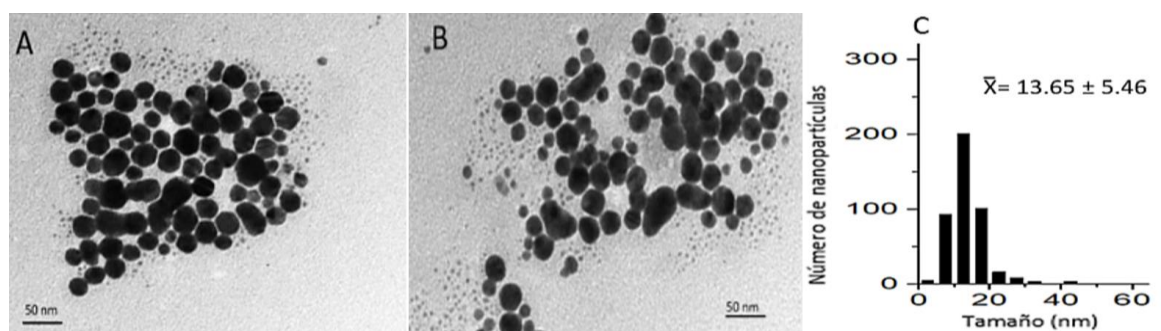


Figura 22. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo *G. sessile* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

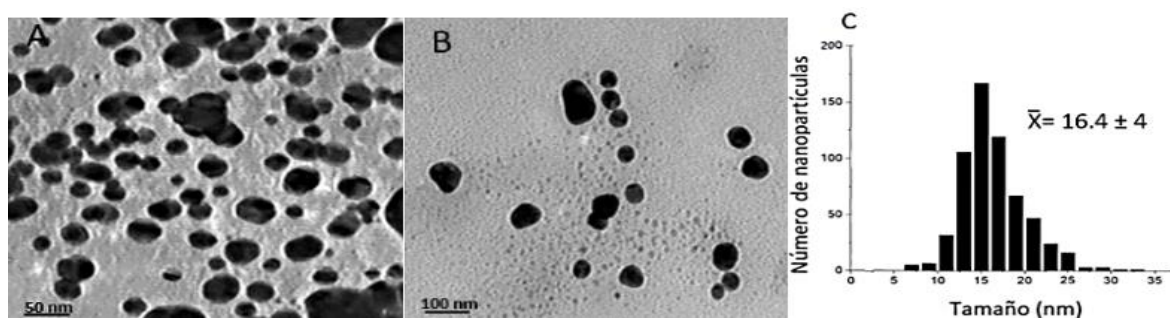


Figura 23. Imágenes TEM de nanopartículas de oro sintetizadas con el sobrenadante del hongo filamentoso *T. asperellum* (A, B). Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas (C).

Cada especie de hongo sintetizó AuNPs de diferentes tamaños. El hongo *A. alternata* sintetizó AuNPs con tamaño promedio y desviación estándar de 9.59 ± 2.98 nm (Figura 19). Las especies de *Trichoderma* sintetizaron AuNPs con tamaños promedio de 24.7 ± 7.66 nm y 16.46 ± 4 nm (Figura 20 y 23). En el caso de los hongos *B. cinerea* y *G. sessile* los tamaños promedio fueron de 16 ± 5.09 nm y 13.65 ± 5.46 nm (Figura 21 y 22).

3.4 Evaluación SERS

3.4.1 Espectro Raman del azul de metileno

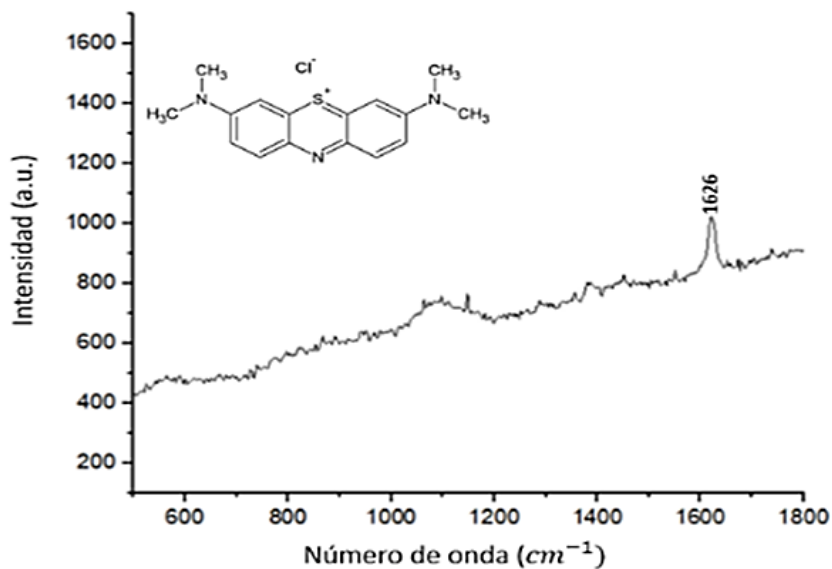


Figura 24. Espectro Raman del azul de metileno (MB).

En la figura 24 se muestra el espectro Raman del azul de metileno a una concentración de 0.01 %, caracterizado por la banda 1626 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del anillo C-C al ser excitado por fotones de longitud de onda de 532 nm.

3.4.2 Espectros Raman del MB con sobrenadante fúngico

Con el objetivo de determinar el efecto del sobrenadante utilizado para la síntesis de AuNPs en la señal Raman del azul de metileno, se evaluó la eficacia del sobrenadante en el incremento de la intensidad del esparcimiento Raman del MB.

Para ello se realizó un análisis del espectro Raman del sobrenadante fúngico del hongo *G. sessile* y el MB. Tomando como base la banda característica del MB localizada en el número de onda 1626 cm^{-1} (Figura 24). Los resultados mostraron que no hubo un incremento en la intensidad del espectro. Por lo que, el efecto SERS no se atribuye a la solución orgánica proveniente de los hongos filamentosos. De igual forma,

se realizó el análisis del espectro SERS del azul de metileno cuando se usan las AuNPs sintetizadas con el sobrenadante del hongo *G. Sessile*, sin tratamiento a 400 °C, para determinar el efecto de las AuNPs con materia orgánica. Se encontró que las AuNPs cubiertas de material orgánico no contribuyen al mejoramiento de la intensidad del espectro Raman del MB (Figura 25).

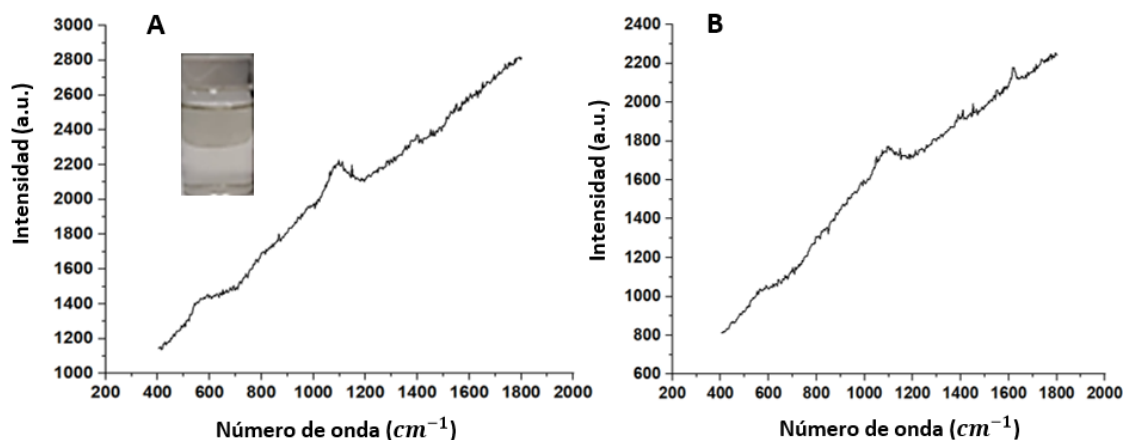


Figura 25. Espectros Raman del MB + sobrenadante (A) y AuNPs sin tratamiento (B) sintetizadas por el hongo *G. sessile*.

3.4.3 Espectros SERS del azul de metileno con AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente y 60 °C por diferentes hongos filamentosos

Los hongos *A. alternata* (A) y *B. cinerea* (C) sintetizaron AuNPs con una variedad de formas y tamaños. En este caso, las AuNPs de estos hongos presentaron un factor de mejora de la intensidad SERS del azul de metileno de 6.58 y 1.8 respectivamente. Las AuNPs sintetizadas por el hongo *G. sessile* presentaron un incremento de la señal SERS de 3.6. Por otro lado, las AuNPs obtenidas utilizando el sobrenadante de las especies de *Trichoderma* presentaron una mayor distribución de NPs con formas esféricas y dimensiones menores a 50 nm. El factor de mejora de la intensidad SERS de las AuNPs sintetizadas por estos hongos fue de 10.12 y 9.5 (Figura 26). En la figura 27 se observa que el incremento del efecto SERS del MB de las AuNPs sintetizadas por los hongos a 60 °C. El hongo *T. atroviride* presentó un factor de mejora de 7.8. Las AuNPs sintetizadas utilizando el hongo *B. cinerea* mostraron un factor de mejora del esparcimiento Raman 3.7. Las AuNPs obtenidas a partir del sobrenadante del hongo *T. asperellum* aumentaron la intensidad de la señal Raman del azul de metileno hasta 11.25 veces. Las AuNPs sintetizadas utilizando el hongo *G. sessile* mostraron un factor de mejora de la intensidad SERS del azul de metileno de 13.06. Por último, se observó que las AuNPs sintetizadas por el hongo *A. alternata* incrementó el efecto SERS del azul de metileno hasta

12.71 veces. Todas las nanopartículas de oro sintetizadas por cada especie de hongo a temperatura ambiente y 60 °C mejoraron la intensidad del espectro Raman del azul de metileno.

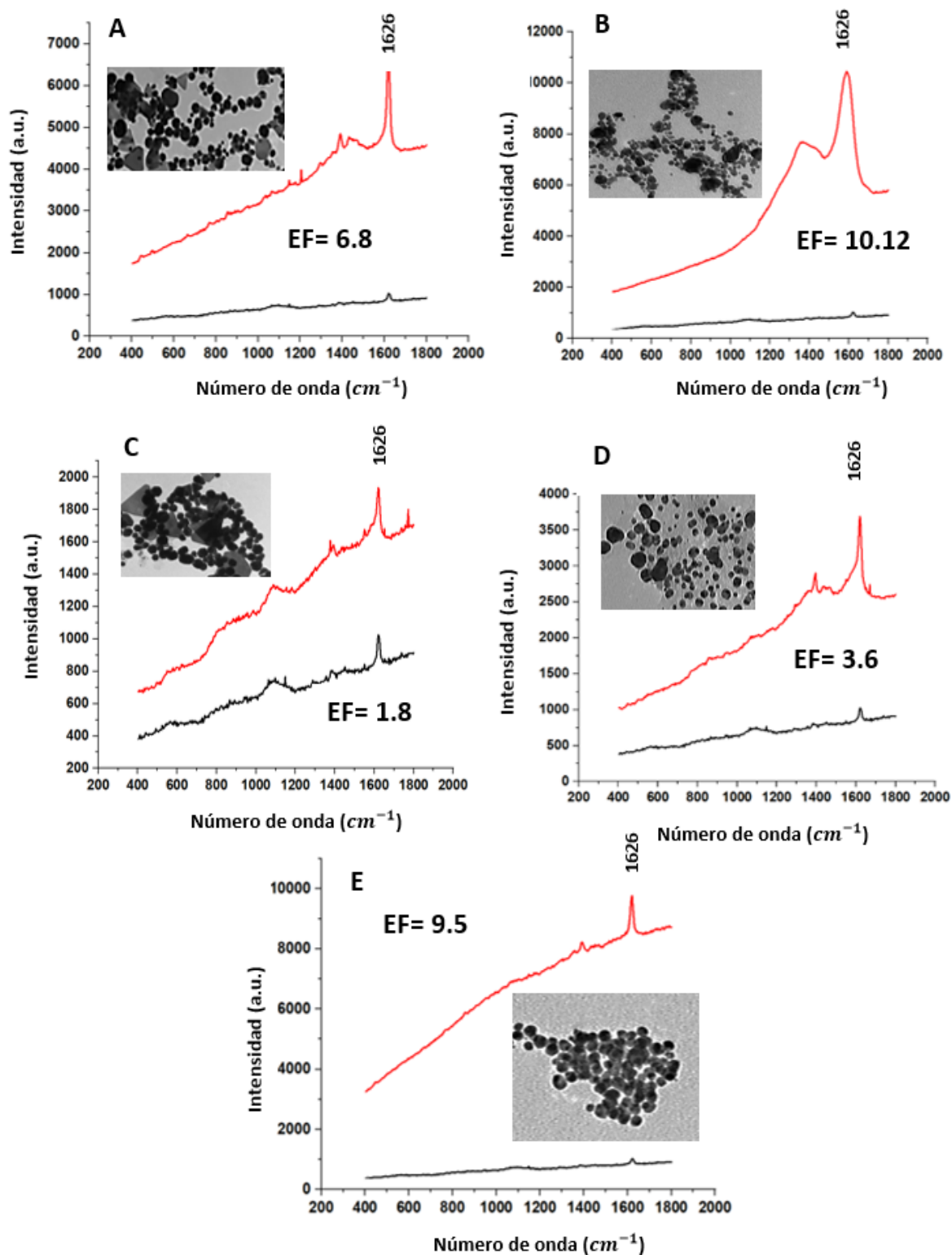


Figura 26. Espectros SERS del azul de metileno con AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente por diferentes hongos *A. alternata* (A), *T. atroviride* (B) *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E).

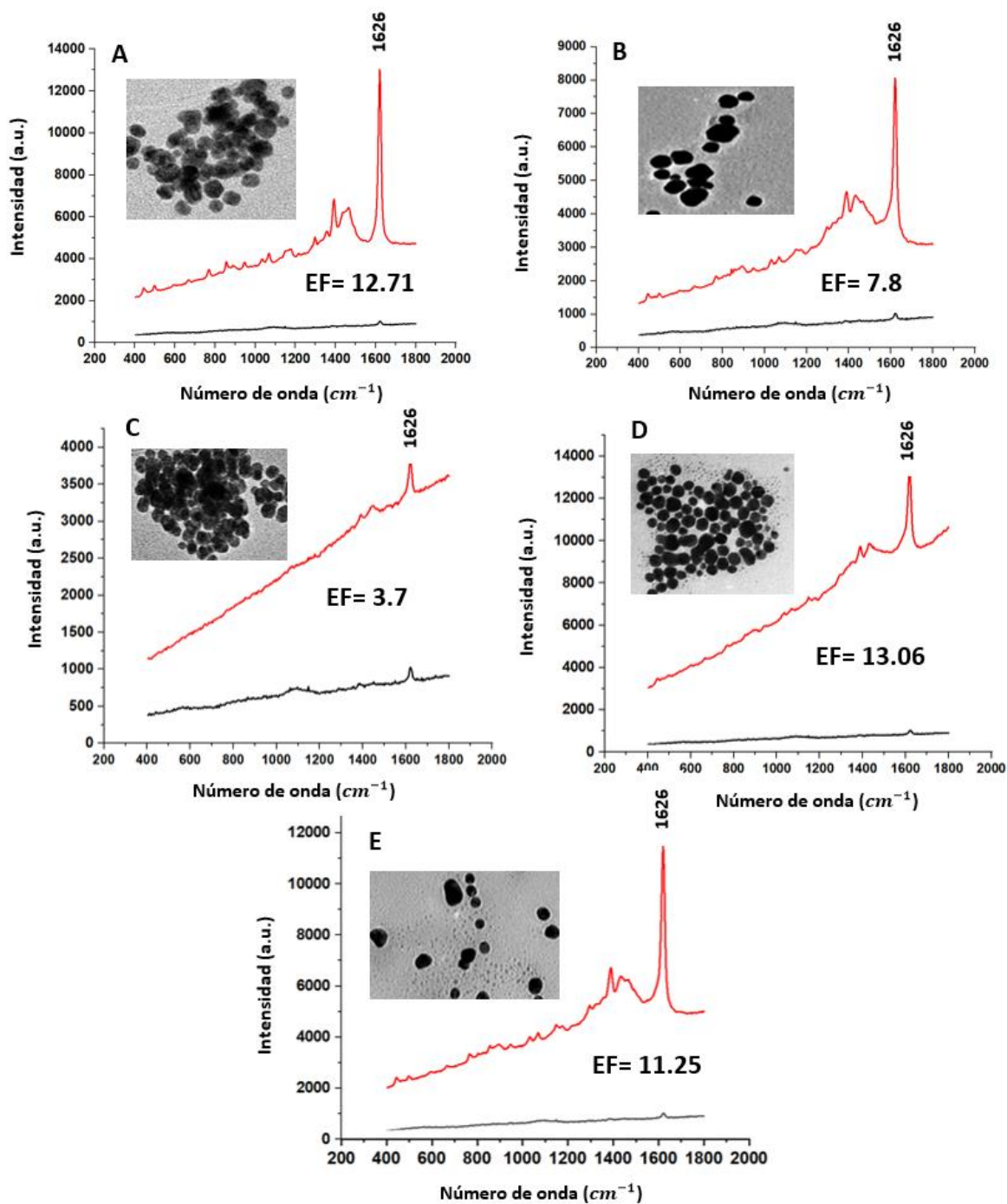


Figura 27. Espectros SERS del azul de metileno con AuNPs sintetizadas a 60 °C por los hongos *A alternata* (A), *T. atroviride* (B), *B. cinerea* (C), *G. sessile* (D) y *T. asperellum* (E).

Todos los espectros obtenidos de las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente y 60 °C (Figura 28), exhibieron un incremento en la intensidad del esparcimiento Raman, correspondiente a la banda localizada en el número de onda 1626 cm^{-1} del MB. Las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente

utilizando el sobrenadante del hongo *T. atroviride* presentaron un incremento en la intensidad del espectro SERS del azul de metileno con un factor de mejora de 10.12 veces (espectro púrpura). En el caso de las AuNPs sintetizadas a 60 °C utilizando el sobrenadante de *T. asperellum*, *A. alternata* y *G. sessile* presentaron mayor incremento en la intensidad del espectro SERS del azul de metileno, con un factor de mejora de 11.25 (espectro verde), 12.71 (espectro azul) y 13.06 (espectro rojo). Esto demuestra la capacidad de las AuNPs sintetizadas por métodos biológicos de incrementar la intensidad del esparcimiento Raman del azul de metileno. Dado que el efecto SERS depende de la longitud de onda de excitación, se observó que en el caso donde las AuNPs presentan la resonancia plasmónica de superficie cercana a 532 nm muestran mejor capacidad de reforzar la señal Raman. Por lo tanto, generan el mayor incremento en el esparcimiento Raman intensificando la banda en 1626 cm^{-1} del azul de metileno.

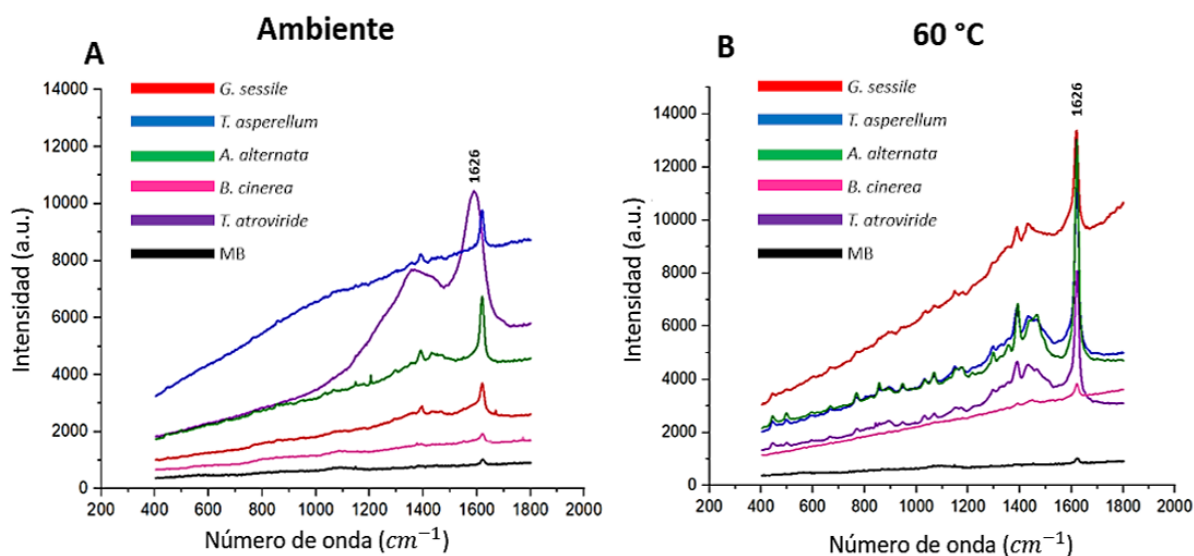


Figura 28. Representación gráfica de la comparación del efecto SERS de las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente (A) y 60 °C (B) por diferentes hongos filamentosos.

Capítulo 4. Discusión

La síntesis de las AuNPs se corroboró mediante la caracterización de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) por espectroscopía UV-Vis. La longitud de onda de la resonancia (absorción óptica) del SPR depende de la forma y tamaño de las nanopartículas. Las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente con el sobrenadante de los hongos *A. alternaria*, *T. atroviride* y *B. cinerea* presentaron espectros de absorción de 530 y 540 nm (Figura 8). En la figura 8 se observa la presencia de un segundo plasmón de superficie alrededor de los 700 nm, lo cual se podría atribuir a la presencia de una variedad de formas (triangulares y algunas irregulares) de las AuNPs formadas por los hongos *A. alternata* y *B. cinerea*. Las nanopartículas metálicas de forma triangular tienden a presentar un comportamiento complejo en diferentes longitudes de onda óptica, de manera que pueden exhibir más de un sólo SPR (Smith et al., 2000). Las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente utilizando el hongo *T. asperellum* (Figura 8) presentó un espectro de absorción de 580 nm. La posición del SPR de las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente por las diferentes especies de hongos indica la formación de AuNPs con una distribución de tamaños de 10 nm hasta 100 nm. En el caso de las AuNPs sintetizadas a 60 °C utilizando el sobrenadante de los hongos *A. alternata*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *B. cinerea* y *G. sessile* (Figura 16) presentaron espectros de absorción entre 525 y 550 nm, estos espectros corroboraron la formación de AuNPs de forma esféricas con tamaños menores a 50 nm. En las imágenes obtenidas por TEM se observó la formación de las AuNPs sintetizadas utilizando el sobrenadante de cada una de las especies de hongos con una variedad de tamaños y morfología (triangulares, esféricas, semiesféricas e irregulares). En el caso de las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente y diferentes pH utilizando el sobrenadante de los hongos *A. alternata* y el hongo *B. cinerea* presentaron formas cuasi-esféricas y una variedad de formas, principalmente triángulos, con un intervalo de tamaño principal de 20 a 40 nm, similares a las AuNPs sintetizadas bajo las mismas condiciones que han sido reportadas por estos hongos (Sarkar et al., 2011; Castro et al; 2014). Las AuNPs sintetizadas por las especies de *Trichoderma* y el hongo *G. sessile* presentaron formas esféricas y cuasiesféricas principalmente con tamaños de 5 a 50 nm. Por otro lado, las AuNPs sintetizadas a 60 °C utilizando el sobrenadante purificado de cada una de las especies de hongo (*A. alternata*, *T. atroviride*, *B. cinerea*, *G. sessile* y *T. asperellum*) presentaron morfologías esféricas y semiesféricas con una distribución de tamaños menores a 50 nm. Por lo que la diferencia entre las características de las AuNPs podría atribuirse principalmente a la diversidad de compuestos extracelulares producidos en el proceso del crecimiento de cada uno de los hongos involucrados en la formación de las nanopartículas. De igual forma se observó que la temperatura es un factor importante que influye en la formación de las diferentes formas y tamaños de las nanopartículas. Las AuNPs sintetizadas presentaron tamaños promedio de 66 nm a 701 nm obtenidos

mediante análisis DLS. Las nanopartículas que presentan un potencial Z de -30 mV a +30 mV se consideran estables (McNeil et al., 2010). En este caso las AuNPs sintetizadas presentaron una carga eléctrica con valores de -1.95 mV a -29.9 mV, lo cual podría estar relacionado a los diferentes compuestos orgánicos con cargas negativas del sobrenadante de los hongos. Por lo que se genera una fuerza de repulsión favoreciendo la estabilidad de las AuNPs. En estudios preliminares se ha identificado mediante espectroscopía infrarroja (IR) algunos grupos funcionales como: alcoholes, aminas y carbonilos provenientes de los hongos que podrían estar asociados a pironas, terpenoides y esteroides (Ponnam et al., 2016). En otros estudios se ha reportado la enzima nitrato reductasa como la responsable de la biorreducción de los iones metálicos y la síntesis de nanopartículas (Barabadi et al., 2014).

Para la evaluación del efecto SERS de las AuNPs se utilizó el azul de metileno. La materia orgánica de la superficie de las AuNPs obtenidas se eliminó sometiendo a un tratamiento térmico a 400 °C. Para la evaluación de las propiedades SERS se utilizó un sistema micro Raman a una longitud de onda de 532 nm. Se tomó como referencia el cambio en la intensidad de la banda característica del MB localizado en el número de onda 1626 cm^{-1} para obtener el factor de mejora (EF). El factor de mejora está definido por $EF = I_{\text{SERS}}/I_{\text{R}}$, donde I_{SERS} es la intensidad de la señal Raman utilizando nanopartículas y donde I_{R} es la intensidad de la señal Raman sin nanopartículas (Ávila et al., 2022). Los resultados anteriores indicaron que las AuNPs sintetizadas con los diferentes hongos presentaron excelentes propiedades SERS con un incremento en la intensidad del esparcimiento Raman del azul de metileno (MB) entre 1.8 a 13.06 veces. Las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente utilizando el sobrenadante de los hongos *B. cinerea* y *A. alternata*, *T. asperellum* y *G. sessile* presentaron un factor de mejora de la intensidad SERS del azul de metileno menor a 10. Se observó que cada una de las muestras de AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente y 60 °C presentaron un efecto distinto en el esparcimiento Raman incrementando la intensidad del espectro SERS en la banda 1626 cm^{-1} del MB. Las AuNPs sintetizadas a temperatura ambiente por el hongo *T. atroviride* y las AuNPs sintetizadas a 60 °C por los hongos, *T. Asperillum*, *A. alternata*, y *G. sessile* presentaron un incremento de la señal SERS de hasta 10.12, 11.25, 12.71 y 13.06 veces. Las AuNPs sintetizadas por estos hongos presentaron el efecto SERS de mayor magnitud. En este estudio se observó que las AuNPs con una mayor distribución de formas esféricas y un SPR cercano a la longitud de onda incidente presentan un mayor incremento en el esparcimiento Raman del MB. La eficacia en la señal SERS de las AuNPs depende de la longitud de onda de excitación, en este caso se usó la longitud de onda de 532 nm que es cercana a la resonancia plasmónica de la mayoría de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo. Se conoce que las propiedades SERS de las nanopartículas metálicas son más sensibles a la morfología. Hasta el momento la teoría más aceptada del origen del fenómeno SERS revela que el

incremento en el esparcimiento Raman de las moléculas, se genera a partir del reforzamiento del campo electromagnético generado en la superficie de las nanopartículas.

Ya se ha reportado la capacidad de las AuNPs sintetizadas por métodos biológicos como materiales para producir señales SERS. Santos et al., (2015) reportó AgNPs sintetizadas a partir de extractos de cáscara de cítricos de especies tal como: *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantifolia* que mejoraron la intensidad del espectro Raman del MB y la rodamina 6G. Otro estudio reciente, realizado por (Ávila et al., 2022) mostró que nanopartículas de plata (AgNPs) de forma esférica y tamaños menores a 50 nm presenta una mayor capacidad de incrementar el efecto SERS del azul de metileno a una longitud de onda de 532 nm en comparación con nanopartículas que presentan una variedad de formas y tamaños. Las nanopartículas con variedad de formas y tamaños presentan mayor capacidad de incrementar el esparcimiento Raman cuando se utiliza un láser de longitud de onda de 632 nm. Este efecto se observó a través de un análisis SERS con AuNPs sintetizadas utilizando el extracto del hongo *N. crassa* (Quester et al., 2013), donde se observó que AuNPs con diferentes formas triangulares, esféricas, semiesféricas y algunas irregulares presentaron mayor incremento del efecto SERS del MB hasta 40 veces al ser excitadas con un láser a una longitud de onda de 632 nm. Por lo que se demostró que las AuNPs sintetizadas por el método biológico descrito anteriormente utilizando hongos filamentosos refuerzan selectivamente la señal SERS del MB. Finalmente, en este estudio se demostró que se puede utilizar las AuNPs sintetizadas por los hongos (*A. alternata*, *B. cinera*, *G. sessile*, *T. atroviride* y *T. asperellum*) para detectar de forma rápida y eficaz el azul de metileno mediante espectroscopía Raman. Los resultados obtenidos han demostrado la eficacia de las AuNPs sintetizadas por diferentes especies de hongos para mejorar el esparcimiento Raman del MB. Por lo tanto, las AuNPs sintetizadas por estos microorganismos presentan excelentes propiedades SERS que podrían ser aplicadas en futuros análisis para la detección de otras moléculas o biomoléculas.

Capítulo 5. Conclusiones

Las AuNPs sintetizadas por los diferentes hongos a temperatura ambiente y 60 °C presentaron diversidad de tamaños y morfologías (triangulares, esféricas, semiesféricas y algunas irregulares). Los diferentes compuestos orgánicos extracelulares de cada uno de los hongos y la temperatura podrían ser los factores principales involucrados en la diferencia de la forma y tamaño de las AuNPs sintetizadas. Se demostró que las AuNPs donde predominan formas esféricas o semiesféricas, si se excitan a una longitud de onda de 532 nm, éstas presentan una mayor capacidad de mejorar el esparcimiento Raman del MB. La eficacia de las AuNPs para aumentar la intensidad del espectro SERS es mayor si la longitud de onda del láser utilizado está cerca de la resonancia del plasmón superficial de las AuNPs, en este caso, alrededor de los 530 nm. Las AuNPs sintetizadas a 60 °C por los hongos *T. asperillum*, *A. alternata* y *G. sessile* presentaron mayor capacidad de mejorar el espectro SERS del MB logrando un incremento en la intensidad de la señal Raman hasta 11.25, 12.71 y 13.06. La mejora en la señal Raman del MB se debe a la absorción plasmónica de las AuNPs. Se puede concluir que las AuNPs sintetizadas por estos hongos presentan excelentes propiedades SERS.

Literatura citada

- Abdel, M., Zohri, A. (2018). Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Trichoderma hamatum*: optimization, characterization and antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology*, 67(5), 465–475.
- Ávila-Avilés, R. D., Camacho-López, M. A., Becerril-Juárez, I. G., Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R. (2022). Biosynthesis of SERS active silver nanostructures using *Anemopsis californica* extract. *MRS Advances*, 7(1), 12-17. doi.org/10.1557/s43580-022-00235-0.
- Ávila, R., Camacho, M., Castro, E., Dorazco, A., Hernández, N., Vilchis, A. (2020). SERS properties of biogenic gold nanoparticles synthesized using *Anemopsis californica* extract. *MRS Advances*, 5(63), 3397-3406.
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Mohammadi, M., Alizadeh, A., Naghibi, F. (2014). Microbial mediated preparation, characterization and optimization of gold nanoparticles. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1493-1501. doi.org/10.1590/s1517-83822014000400046.
- Castro, M., Cottet, L., Castillo, A. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles by extracellular molecules produced by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Materials Letters*, 115, 42–44. doi.org/10.1016/j.matlet.2013.10.020.
- Corzo, Alberto. (2012). Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de HAuCl₄. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(2), 79-90.
- Cruz, A., Rodríguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A., Creus, H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Das P, Chini TK. (2012). Spectroscopy and imaging of plasmonic modes over a single decahedron gold nanoparticle: a combined experimental and numerical study. *American Chemical Society*, 116, 25969-25976. doi.org/10.1021/jp3103782.
- Elahi, N., Kamali, M., Baghersad, M. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Nanobiotechnology Research Center*. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088.
- Elegbede, J., Lateef, A., Azeez, M., Asafa, T., Yekeen, T., Oladipo, I., Aina, D., Beukes, L., Gueguim, E. (2018). Biofabrication of gold nanoparticles using xylanases through valorization of corncob by *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum*: antimicrobial, antioxidant, anticoagulant and thrombolytic activities. *Springer nature*, 11(3), 781-791. doi: 10.1007/s12649-018-0540-2.
- Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: Their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*. Vol. 4(ISC- 2014), 1-3.
- Hu, J., Wang, Z., & Li, J. (2007). Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection. *Sensors*, 7(12), 3299-3311. doi: org/10.3390/s7123299.
- Huang, X., El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13-28. doi: 10.1016/j.jare.2010.02.

- Hulkoti, N., Taranath, T. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes: A review. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474–483. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.05.027.
- Hurtado, B., Cortez, R., Ramírez, L, Larios, E., Alvarez, R., Rocha, O., Delgado, Y., Martinez, C., Arizpe, H., Hernández, A., Flores, M. (2016). Instant synthesis of gold nanoparticles at room temperature and SERS applications. *Physics Letters A*, 380(34), 2658–2663. doi: 10.1016/j.physleta.2016.05.052.
- Kah, J., Kho, K., Lee, C., James, C., Sheppard, R., Shen, Z., Soo, K., Olivo, M. (2007). Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 2(4), 785–798.
- Kottmann, Jörg., Olivier, Martin. (2000). Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a nonregular shape. *Optics Express* Vol. 6, No. 11, 213-219.
- McNeil, S. (2010). Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*. doi: 10.3797/scipharm.br-11-01.
- Menon, S., Rajeshkumar S., Kumar, V. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource efficient technologies*, 3(4), 516-527. doi: 10.1016/j.reffit.2017.08.002.
- Minutella, E., Schulz, F., Lange, H. (2017). Excitation-Dependence of Plasmon-Induced Hot Electrons in Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 8(19), 4925-4929. doi: 10.1021/acs.jpcllett.7b02043.
- Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K., Nautiyal, C. (2014). Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. *Bioresource-Efficient Technologies*, 166, 235-242. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.085.
- Mongue, M. (2009). Nanopartículas de platamétodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Revista Anales de Química*, 105 (1), 33-41.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B., Choudhury, S., Tewari, R., Tyagi, A., Kale, S. (2012). Synthesis of uniform gold nanoparticles using non-pathogenic biocontrol agent: Evolution of morphology from nanospheres to triangular nanoprisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 148-152. doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.085.
- Ponmurugan, P. (2016). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Trichoderma atroviride* for the biological control of phomopsis canker disease in tea plants. *Institution of Engineering and Technology*, 11(3), 261-267. doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0029.
- Prathna, C., Lazar, M. Chandrasekaran, Ashok, M., Mukherjee, Amitava, M. (2010). Biomimetic synthesis of nanoparticles: science, technology & applicability. *Biomimetics Learning from Nature*.
- Quester, K., Avalos, M., Vilchis, A., Camacho, M., Castro, E. (2013). SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0077486.
- Reactivos química Meyer. (2018). Hoja de datos de seguridad. Química Suastes S.A. DE C.V. Ciudad de México. https://reactivosmeyer.com.mx/datos/pdf/reactivos/hds_2327.pdf.

- Rivera, A., Guzmán R. (2015). Espectroscopía Raman de nanopartículas de oro y usos biomédicos. Revista de investigación científica: Jóvenes en la ciencia. Vol. 1. No.2.
- Santos, E., Madalossi, N., Sigoli, F., Mazali, I. (2015). Silver nanoparticles: green synthesis, self-assembled nanostructures and their application as SERS substrates. *New Journal of Chemistry*, 39(4), 2839-2846. doi.org/10.1039/c4nj02239d.
- Sarkar, J., Ray, S., Chattopadhyay, D., Laskar, A., Acharya, K. (2011). Mycogenesis of gold nanoparticles using a phytopathogen *Alternaria alternata*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4), 637-643. doi: 10.1007/s00449-011-0646-4.
- Schröfel, A., Kratošová, G., Šafařík, I., Šafaříková, M., Raška, I., Šor, L. (2014). Applications of biosynthesized metallic nanoparticles. A review. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4023-4042. 10.1016/j.actbio.2014.05.022.
- Zhang, M., Li, X., Pan, J., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, C., Yan, X., Liu, X., Lu, G. (2021). Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein in untreated saliva using SERS-based biosensor. *Biosensors and bioelectronics*, 190, 113-421. doi: 10.1016/j.bios.2021.113421.
- Zhang, Y., Mi, X., Tan, X., Xiang, R. (2019). Recent progress on liquid biopsy analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Theranostics*, 9(2), 491-525. doi: 10.7150/thno.29875.
- Zhang, Y., Zheng, Guo., Kong, F., Xhi, Z., Wang, K., Zhang, X., Cui, X. (2011). Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts. *International Journal of Nanomedicine*, 2899. doi: 10.2147/IJN.S24785.
- Zhong, J. (2009). *Optical properties and spectroscopy of nanomaterials*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.