



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Instituto de Física “Luis Riveras Terrazas”

**Uso de hongos como bioplantillas vivas para la
fabricación de estructuras metálicas 1D**

Tesis presentada por

Dulce Natalia Castillo López

para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias (en la especialidad de Ciencias de
Materiales)**

Dirigida por

Dr. Umapada Pal

Puebla, México

Junio 2016

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Instituto de Física “Luis Riveras Terrazas”

**Uso de hongos como bioplantillas vivas para la
fabricación de estructuras metálicas 1D**

Tesis presentada por
Dulce Natalia Castillo López

para obtener el grado de
**Doctor en Ciencias (en la especialidad de Ciencias de
Materiales)**

Dirigida por
Dr. Umapada Pal

Puebla, México

Junio 2016

Agradecimientos

Al **Instituto de Física “Luis Rivera Terrazas”**, por todo lo que me ha brindado durante mi estancia como estudiante del programa doctoral.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca que me otorgó para estudiar el doctorado.

Agradezco a mi asesor de tesis, el **Dr. Umapada Pal**, por sus enseñanzas y por el tiempo que dedicó para dirigir esta tesis.

Al **Mtro. Moisés Graciano Carcaño Montiel** y a la **Dra. Lucía López Reyes** del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la BUAP “Microbiología del Suelo”, por brindarme las facilidades para utilizar sus instalaciones e infraestructura y por su apoyo en todo momento en la realización de este trabajo.

A **mis compañeras** del centro de Investigación de Microbiología del Suelo del área de producción de biofertilizantes, en especial a la responsable de producción, la **Ing. A. F. Elizabeth Portillo Manzano**, quien me apoyo, me dio consejos y me ayudo en todo lo necesario en el laboratorio, haciendo de mi estancia un grato momento.

A la **Vicerrectoría de Estudios de Posgrado de la BUAP (VIEP)**, por el apoyo económico que me brindó para la terminación del trabajo de tesis.

A mis padres: Argelia López Orozco y Víctor Manuel Castillo Castillo

A todas las personas que me ayudaron a llegar hasta aquí

Resumen

Utilizando métodos *verdes* y respetuosos con el medio ambiente, fabricamos, en este trabajo, nanopartículas metálicas de distintos tipos (Au, Ag, Zn) con dispersiones de tamaños razonables. Las condiciones de crecimiento de estas nanopartículas metálicas (tanto las de metales nobles como las otras) fueron optimizadas para reductores/estabilizadores biológicos como el extracto de papa (EP) y la D-glucosa (DG). Todas las nanopartículas fabricadas son estables durante varios meses e, inclusive, años.

Por otra parte, estudiamos el proceso de crecimiento de los hongos filamentosos *Trichoderma asperellum* (*Tas*) y *Aspergillus sydowii* (*Asy*) en soluciones nutritivas de EP y DG para utilizarlos como bioplantillas vivas en la fabricación de ensamblajes de nanopartículas metálicas prefabricadas. Las esporas de los hongos cultivados en medios de PDA (por las siglas del nombre en inglés: *Potato Dextrose Agar*) fueron inoculadas en soluciones coloidales de nanopartículas metálicas (Au, Ag y Zn) previamente preparadas para monitorear los procesos de crecimiento de las hifas y, además, el proceso de incorporación de las nanopartículas metálicas en las paredes de las hifas. Se observó que, aun cuando el medio coloidal utilizado no es ideal, los hongos (*Tas* y *Asy*) sí crecen en estos medios y las nanopartículas metálicas se incorporan a sus hifas. Las nanopartículas de Au y Ag de tamaños mayores de 15 nm se acumulan en las paredes celulares de las hifas; las nanopartículas de Zn de tamaños menores de 5 nm atraviesan la membrana citoplasmática y logran ubicarse en el citoplasma. .

Aparte de investigar los procesos de incorporación de las nanopartículas metálicas a las hifas de estos hongos, desarrollamos un método para fabricar microestructuras plasmónicas, utilizando las estructuras híbridas hongos/NPs-Au, para aplicarlas como sustratos SERS. Por medio de un tratamiento térmico controlado de las estructuras híbridas, fue posible formar y extraer microestructuras tubulares porosas de Au, de varias micras de longitud, $\sim 4 \mu\text{m}$ de diámetro y de superficies rugosas, ideales para su utilización como sustratos SERS.

El funcionamiento de los microtubos de Au fabricados en este trabajo como sustratos SERS fue corroborado utilizándolos en la detección de varios analitos orgánicos, como el azul de metileno, la rodamina 6G, el naranja de metilo y la D-glucosa, a bajas concentraciones. Los resultados obtenidos revelan que los microtubos fabricados utilizando hongos filamentosos como bioplantillas son ideales para fabricar sensores orgánicos y biológicos de alta sensibilidad. Los factores de aumento (aumento en la intensidad de la señal Raman) estimados para los analitos utilizados varían entre 10^{11} y 10^{10} , valores que, no solamente son más altos que los reportados para sustratos SERS fabricados con nanoestructuras plasmónicas de Au, sino que muestran la capacidad de estos sustratos para la detección de una sola molécula (*single molecule detection*). La sensibilidad de nuestras microestructuras permite la detección de hasta 0.05 ppm de azul de metileno en solución acuosa.

Abstract

Using *green* and environmentally-friendly methods, we fabricated, in this work, several types (Au, Ag, and Zn) of metallic nanoparticles with reasonable size dispersions. The growth conditions of these (noble and non-noble) metallic nanoparticles were optimized for biological reducing/stabilizing agents like potato extract (PE) and D-glucose (DG). All the nanoparticles fabricated are stable for several months and, even, for years.

On the other hand, we studied the growth process of filamentous fungi like *Trichoderma asperellum* (*Tas*) and *Aspergillus sydowii* (*Asy*) in EG and PG nutrient solutions to use them as live bio-templates to fabricate ensembles of previously fabricated nanoparticles. Spores of fungi cultivated in PDA (*potato dextrose agar*) media were inoculated into colloidal solutions of previously prepared metallic nanoparticles (Au, Ag, and Zn) to monitor the growth process of the hyphae and, additionally, the process of incorporation of the metallic nanoparticles into the wall of the hyphae. It was observed that, even though the colloidal media used are not ideal, the fungi (*Tas* and *Asy*) do grow in these media and the metallic nanoparticles incorporate into their hyphae. The Au and Ag nanoparticles with sizes bigger than 15 nm accumulate in the cell wall of the hyphae; The Zn nanoparticles with sizes less than 5 nm cross the cytoplasmic membrane, reach the cytoplasm, and stay there.

Besides researching the incorporation processes of the metallic nanoparticles into the hyphae of these fungi, we developed a method to fabricate plasmonic microstructures using the hybrid structures formed by Au nanoparticles and fungal hyphae. By a controlled thermal treatment of these hybrid structures, it was possible to form and extract porous tubular Au microstructures having several microns in length, $\sim 4\ \mu\text{m}$ in diameter, and rough surfaces; these microtubes are ideally suited to function as SERS substrates.

The Au microtubes fabricated in this work were tested by using them to detect several organic analytes like methylene blue, rhodamine 6G, methylene orange, and D-glucose at low concentrations. The results obtained show that the microtubes fabricated by using filamentous fungi as bio-templates are indeed ideally suited for the fabrication of high-

sensitivity organic and biological sensors. The estimated enhancement factors (the enhancement in Raman signal intensity) for the analytes used vary between 10^{11} and 10^{10} . These values are not only higher than those reported for SERS substrates fabricated with Au plasmonic nanostructures but also show that our substrates are capable of *single molecule detection*. The sensitivity of our microstructures enables the detection of down to 0.05 ppm of methylene blue in aqueous solution.

Publicaciones

D. N. Castillo-López y U. Pal. Green synthesis of Au nanoparticles using potato extract: stability and growth mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* **16**, 2571, 2014.

Participación en congresos

“Use of *Trichoderma sp.* as living template for the organization of biosynthesized Au nanoparticles”, D. N. Castillo-López, U. Pal, M. G. Carcamo, y L. López, 4th Mexican Workshop on Nanostructured Materials, Puebla, Puebla, 2013.

“Synthesis of stable Au nanoparticles using potato extract”, D. N. Castillo-López y U. Pal, 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, Lisbon, Portugal, Enero 2014.

“Simple Biosynthesis of Au, Ag and Zn Nanoparticles”, D.N. Castillo-López y U. Pal, VII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, Ensenada, Baja California, Octubre 2014.

Índice general

Índice de figuras.....	XIII
------------------------	------

Índice de tablas.....	XX
-----------------------	----

Capítulo 1. Introducción y revisión del estado del arte

Introducción.....	1
1. Antecedentes	
1.1. Síntesis coloidal de nanopartículas metálicas.....	8
1.2. Biosíntesis de nanopartículas metálicas.....	12
1.3. Dispersión Raman amplificada por superficies.....	17
1.4. Autoensamble de nanoestructuras metálicas.....	23
Bibliografía.....	28

Capítulo 2. Bioplantillas (Hongos)

Introducción.....	53
2.1. Características de la estructura fúngica.....	55
2.2. Parámetros y requisitos para el crecimiento de las bioplantillas: nutrientes, temperatura y pH.....	58
2.3. Medio de cultivo artificial o sintético para el crecimiento de las bioplantillas.....	63
Bibliografía.....	67

Capítulo 3. Biosíntesis de nanopartículas metálicas

Introducción.....	68
3.1. Biosíntesis coloidal de NPs-M (Au, Ag y Zn)	69
3.1.1. Biosíntesis de NPs-Au utilizando extracto de papa.....	69

3.1.2. Biosíntesis de NPs-M (Au, Ag y Zn) utilizando D-glucosa.	72
3.2. Resultados y discusión.....	74
3.2.1. Solución coloidal de Au utilizando extracto de papa.....	74
3.2.1.1. Mecanismos de reducción y estabilización.....	83
3.2.2. Solución coloidal de NPs-M usando D-glucosa.....	92
3.2.2.1. Mecanismos de reducción y estabilización.....	97
Bibliografía.....	104

Capítulo 4. Fabricación de estructuras 1D metálicas y su utilización como sustrato SERS

Introducción.....	107
4.1. Soluciones de nutrientes y bioplantillas	108
4.2. Fabricación de estructuras 1D híbridas (hongo/NPs-M).....	109
4.2.1. Inoculación de esporas de los hongos en las soluciones coloidales	109
4.2.2. Fabricación de las estructuras híbridas: hongo/NPs-Au.....	110
4.2.3. Fabricación de las estructuras híbridas: hongo/NPs-Ag y hongo/NPs-Zn.....	113
4.2.4. Resultados para las estructuras híbridas y discusión.....	115
4.3. Fabricación de estructuras metálicas 1D de Au.....	119
4.3.1. Extracción de las bioplantillas (hongos).....	119
4.3.2. Resultados y discusión.	120
4.4. Aplicación de las microestructuras tubulares de Au como sustrato SERS	129
4.4.1. Resultados y discusión “SERS”	133
Bibliografía.....	136
Conclusiones	142

Apéndices

A. Procesos de cultivo e inoculación de las bioplantillas.....	145
B. Espectro de absorción de iones de Zn.....	148
C. Procesos de centrifugación y sonicación.....	149
D. Proceso de extracción de la bioplantilla	151
E. Cálculo del factor de aumento (FA).....	153
F. Ubicación de las bandas SERS obtenidas para cada analito.....	156

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema del crecimiento de las nanopartículas y su coalescencia. M^0 hace referencia a cualquier átomo metálico neutro.....	10
Figura 1.2. Esquema de estrategias de estabilización de NPs-M. Interacciones de tipo (a) estérico y (b) electrostático.....	10
Figura 1.3. Imágenes de algunas de las plantas utilizadas en las biosíntesis de NPs-M; (a) <i>Medicago sativa</i> , utilizada para la síntesis de NPs de Au (a la derecha aparece una imagen TEM de las NPs [74]); (b) <i>Camellia sinensis</i> , usada para la biosíntesis de NPs de Au (a la derecha se muestra una imagen SEM de las NPs obtenidas [75]); y (c) <i>Opuntia ficus</i> , utilizada para sintetizar NPs-Ag (a la derecha aparece una imagen TEM de las NPs obtenidas).....	14
Figura 1.4. Imágenes de algunos microorganismos utilizados para biosíntesis de NPs-M: (a) Bacteria <i>Rhodopseudomonas capsulata</i> , utilizada para sintetizar NPs de Au y Ag (a la derecha se muestra una imagen TEM de las NPs de Au [92]); (b) <i>Aspergillus</i> sp, hongo utilizado para la síntesis de NPs de Ag (a la derecha se muestra una imagen SEM las NPs obtenidas [88]); (c) Alga <i>Chlorella vulgaris</i> , utilizada para sintetizar NPs y nanoplatos de Au (a la derecha se muestran las NPs de Au).....	15
Figura 1.5. (a) Esquema comparativo de la dispersión Raman y de SERS. (b) Espectro SERS de la rodamina 6G en coloides de Ag (línea roja) y el espectro Raman normal de la misma molécula en agua (línea azul) multiplicado por un factor de 100.....	18
Figura 1.6. (a) Fotografía una película formada por cúmulos de Ag152 sobre un sustrato de vidrio. Se depositaron múltiples gotas para aumentar el grosor de la película; (b) Espectros SERS comparativos de cristal violeta sobre la película: (A) Ag55, (B) Ag152 y (C) NPs-Ag de 3-4 nm. El factor de aumento máximo reportado para estos sustratos es de 10^9	21
Figura 1.7. (a) Imagen SEM de nanocubos electrostáticamente inmovilizados sobre 4-MBA SAMs ($5.5/\mu\text{m}^2$). (b) Esquema de la geometría sándwich nanocubos-SAM sobre sustrato de Au. (c) Espectros de 4-MBA SAMs (1) Raman normal, (2) SERS con 5.5 cubos/ μm^2 , (3) 8.6 cubos/ μm^2 , (4) 15 cubos/ μm^2 , (5) 22 cubos/ μm^2	22

Figura 1.8. (a) Esquema de autoensamble reversible inducido por iones metálicos y el pH de la solución coloidal. Las NPs-Au están funcionalizadas con peptidos carboxilados [158]; (b) Imagen SEM de una monocapa de LB que consiste de NPs-Au encapsuladas por dodecanetiol.....	24
Figura 1.9. Imágenes SEM de dos arreglos de NPs-Au monodispersas en surcos, que comprenden (a) una sola línea y (b) doble línea.....	25
Figura 1.10. Imágenes (a) TEM de nanoalambres de TMV cubiertas con NPs-Au [29]; (b) Nanobarras (25 nm de diámetro y 400 nm de longitud) depositadas sobre la superficie de la bacteria <i>Bacillus cereus</i> [176]; (c) Nanoesferas (45 nm de diámetro) depositadas sobre la superficie de la bacteria <i>Bacillus cereus</i> [176]; (d) Microtubos de Au usando el hongo <i>Penicillium sp.</i> como bioplantilla.....	26
Figura 2.1. Imágenes de microscopía óptica de (a) levaduras, (b) hifas de hongos filamentosos, y (c) una red de hifas (micelio), a menor amplificación.....	54
Figura 2.2. Imágenes de microscopía óptica de hongos filamentosos: (a) imagen macroscópica de una colonia de hongo filamentosos; el color verde que se observa es debido a las esporas que se encuentran en la superficie; (b) hifas del hongo donde se aprecia un ápice (1) y algunas ramificaciones (2); y (c) amplificación de una zona de la imagen 2.2b donde se observan septos (3) y núcleos (4) de la hifa.....	55
Fig. 2.3. Esquema de la punta de una hifa que muestra la pared celular (color café), la cual es delgada en el ápice, pero se va engrosando a medida que aumenta la distancia a él y, luego, mantiene un espesor constante a lo largo de la hifa. El grosor de la pared celular está comprendido entre 125 nm y 250 µm. La línea de color negro representa la membrana plasmática.....	56
Figura 2.4. (a) Imagen de SEM de hifas de <i>Aspergillus fumigatus</i> [6]; (b) imagen de SEM de la sección transversal de una hifa en la que se visualiza la pared celular (1) y la membrana plasmática (2); (c) esquema de la arquitectura de la pared celular del hongo (en general, para los hongos del grupo <i>Ascomycota</i>) constituida mayormente por (1,3) glucanos, manoproteínas, glicoproteínas y proteínas (la capa más externa), y quitina y (1,3), (1,6) glucanos (la capa más interna). La quitina se encuentra muy cerca de la membrana plasmática (M.P.).....	58
Figura 2.5. Gráfica que muestra los diferentes compuestos orgánicos que un hongo puede utilizar como nutrientes, ordenados según su grado de complejidad estructural y el grado de su utilización como nutriente.....	59
Figura 2.6. Esquema de la transformación química del metano en fructosa, la cual, a diferencia del primero, puede ser absorbida por el hongo. La obtención de fructosa a partir del metano es propiciada por diferentes enzimas que el mismo hongo secreta.....	60
Figura 2.7. Rangos de temperatura aproximados (líneas negras) y temperaturas	

óptimas (puntos rojos) para el crecimiento de algunos hongos.....	62
Figura 2.8. Medios de cultivo artificiales utilizados en los laboratorios para el crecimiento de los hongos: (a) sólidos y (b) líquido.....	64
Figura 3.1. (a) Imagen de <i>Solanum tuberosum</i> , (b) micrografía de los granos de almidón de la papa y (c) distribución de los diferentes componentes de la papa y de los constituyentes principales del almidón (amilosa y amilopectina).....	70
Figura 3.2. Estructura química de los polisacáridos (a) amilosa (cadena lineal formada por unidades de $\alpha(1,4)$ D-glucosa) y (b) amilopectina (cadena lineal de $\alpha(1,4)$ D-glucosa con ramificaciones $\alpha(1,6)$ D-glucosa).....	70
Figura 3.3. Presentación esquemática del proceso de preparación de la solución coloidal de NPS-Au.....	72
Figura 3.4. Espectros de absorción de las muestras 1EP, 2EP, 3EP y 5EP, adquiridos para diferentes intervalos de tiempo transcurridos (14 horas, 1, 2, 3 y 10 días) después de la preparación de las muestras. La imagen insertada en cada gráfica es una fotografía de la solución coloidal de Au tomada 10 días después de su preparación.....	75
Figura 3.5. Gráficas de (a) la posición del pico de la RPS en función de la cantidad de EP, 14 horas después de la preparación de las muestras, y (b) la posición del pico de la RPS en función del tiempo (días) transcurrido después de la preparación.....	76
Figura 3.6. Imágenes de TEM típicas de las NPs de Au con sus correspondientes histogramas de distribución de tamaños para las muestras (a)-(c) 1EP (las imágenes fueron adquiridas después de 1, 10 y 60 días de la preparación de la muestra), (d) 2EP, (e) 3EP y (f) 5EP. Para las últimas tres muestras, las imágenes fueron adquiridas 10 días después de su preparación.....	77
Figura 3.7. Espectro EDS de las NPs-Au que presentan las líneas de emisión propias del Au. Las señales de Cu y C en el espectro aparecieron del soporte (rejilla de cobre cubierta de carbón).....	78
Figura 3.8. Imágenes típicas de HRTEM de las NPs-Au sintetizadas y los patrones FFT correspondientes. Las imágenes 1a y 1b muestran dos NPs cristalinas típicas de 1EP, de tamaños de 8 y 9 nm y de forma octaédrica truncada, con facetas formadas por planos (111). Las imágenes 2a y 2b muestran dos NPs de 2EP, cristalinas, de tamaños de 17 y 15.6 nm y de forma icosaédrica con facetas constituidas por planos (111) y (200). Las imágenes 3a, 3b muestran NPs típicas de 3EP, policristalinas, de tamaños de 18 y 13 nm. Las imágenes 4a y 4b muestran NPs de 5EP, policristalinas y de tamaños de 15 y 21 nm. Las NPs presentaron defectos estructurales y/o de crecimiento apreciables en las imágenes HRTEM y en sus respectivos patrones FFT. Las imágenes 1c, 1e, 2c, 2e, 3c, 3e, 4c y 4e son patrones FFT de toda la NP y 1d, 1f, 2d, 2f, 3d, 3f, 4d y 4f son patrones FFT del área seleccionada en cada imagen HRTEM.....	83

Figura 3.9. (a) Tabla que expone los valores de pH medidos de las diferentes muestras preparadas variando la cantidad de EP, antes y después de verter los iones de Au. (b) Gráfica de la variación del pH de acuerdo a la cantidad de EP, antes (puntos azules) y después (puntos rojos) de verter los iones de Au.....	84
Figura 3.10. Representación esquemática del proceso de la hidrólisis ácida de la amilosa y la amilopectina.....	86
Figura 3.11. Representación esquemática de las reacciones químicas que se llevan a cabo en el proceso de reducción de los iones de Au por el EP. La elipse de color verde encierra los átomos que constituyen el grupo aldehído y que son mencionados en el texto como C1, O1 y H1.....	87
Figura 3.12. (a) Una cadena de polisacárido con terminal reductora oxidada; (b) ilustración esquemática de la adsorción de los polisacáridos en la superficie de una NP-Au, a la que se han enlazado a través de los grupos OH ⁻	88
Figura 3.13. (a) Espectros de absorbancia obtenidos en diferentes momentos de tiempo; (b) imagen TEM típica de NPs-Au; (c) histograma de distribución de tamaños; y (d) imagen HRTEM de una NP-Au de 27 nm de tamaño.....	91
Figura 3.14. Espectros de absorción de las NPs-Au, NPs-Ag y NPs-Zn. La banda asociada a la RPS está localizada alrededor de 542, 427 and 327 nm, respectivamente. La gráfica ubicada en el lado inferior derecho muestra la posición del máximo de las bandas de RPS de las NPs de cada uno de los tres metales en función del tiempo.....	94
Figura 3.15. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Ag típicas con el correspondiente histograma de distribución de tamaños insertado en (b). La imagen insertada en (a) es una ampliación de una zona de la rejilla. (c) Imagen de HRTEM de una NP-Ag con su respectivo patrón FFT insertado en el lado inferior derecho. (d) Imágenes de HRTEM de las zonas de la NP encerradas por cuadrados rojos en (c), donde se visualizan los planos cristalinos (franjas), y sus respectivos patrones FFT.....	98
Figura 3.16. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Au con el correspondiente histograma de distribución de tamaños (insertado en a). (c) Imagen de HRTEM de una NP y su patrón FFT (insertado en la misma imagen). (d) Imágenes de HRTEM de las zonas de la NP encerradas por cuadrados rojos en (c) y de los patrones FFT correspondientes. Las NPs-Au están definidas por los planos (111) y (200).....	99
Figura 3.17. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Zn y el correspondiente histograma de distribución de tamaños (insertado en (a)). Las NPs-Zn son monodispersas y de forma esférica y tienen diámetro promedio de 4.6 nm. (c) Imágenes de HRTEM y su patrón FFT (insertado en la misma imagen). En estos últimos se identifica la presencia de los planos (111) y (102). (d) Imágenes de HRTEM y sus respectivos FFT de las zonas encerradas por cuadrados rojos en (c).....	100

Figura 3.18. Esquema de la estabilización de las NPs-M por moléculas de DG y AcDGo: (a) moléculas de D-glucosa, (b) moléculas de DG enlazadas por puentes de hidrógeno, formando cadenas y cúmulos, y (c) NP-M estabilizada por moléculas, cadenas y cúmulos de DG.....	103
Figura 4.1. Gráficas que muestran el número de días que tarda el micelio de los hongos en crecer aproximadamente 50 mm en función de la cantidad de (a) DG y (b) EP.....	109
Figura 4.2. Esquema de la inoculación de las esporas del hongo en una solución coloidal de NPs-Au. Después de aproximadamente 9 días de la inoculación, se apreció que el hongo había crecido en la solución coloidal, volviendo transparente la solución coloidal.....	110
Figura 4.3. Imágenes de microscopía óptica de las hifas de <i>Tas</i> y <i>Asy</i> crecidas en soluciones coloidales de NPs-Au utilizando EP (muestras coloidales del tipo 1EP) con valores de pH menores de 7 (a, b y c) e iguales a 8 o 7 (d, e, f). Las imágenes insertadas son una ampliación de una zona del mismo micelio de la misma muestra (las barras no marcadas son de escala de 10 μ m).....	112
Figura 4.4. Imágenes de las hifas de <i>Tas</i> y <i>Asy</i> crecidas en soluciones coloidales de NPs-Au previamente sintetizadas con DG, con valores de pH de (a) 8, (b) 7 y (c) 8. Las imágenes insertadas son las imágenes amplificadas de algunas zonas del micelio de la misma muestra (la barra blanca hace referencia a la escala de 10 μ m).....	112
Figura 4.5. Imágenes ópticas de las hifas de <i>Tas</i> crecidas en soluciones coloidales de NPs-Ag previamente sintetizadas con DG, con valores de pH de (a) 7, (b) 7 y (c) 8. La imagen insertada en (c) es una ampliación de una zona del micelio de la misma muestra (la barra negra hace referencia a la escala de 10 μ m).....	113
Figura 4.6. Imágenes ópticas de las hifas de <i>Tas</i> y <i>Asy</i> crecidas en soluciones coloidales de NPs-Zn previamente sintetizadas con DG y EP, con valores de pH de (a) 7 (DG), (b) 7 (EP) y (c) 8 (DG). Las imágenes insertadas son una ampliación de una zona del micelio de la misma muestra.....	113
Figura 4.7. Gráficas que muestran el tiempo de crecimiento de aproximadamente 30 mm de micelio con relación a la naturaleza de la solución coloidal. Los círculos y cuadrado segmentados que aparecen en ambas gráficas indican que en ocasiones el crecimiento del hongo no se dio.....	114
Figura 4.8. Imágenes de microscopía óptica de: (a) una hifa ramificada de <i>Tas</i> que se observa completamente negra en casi toda su extensión, excepto en la parte superior izquierda, que se ve menos oscura, lo que indica menor presencia de NPs-Au; (b) una hifa de <i>Asy</i> completamente negra por la presencia de una gran cantidad de NPs-Au en ella y, a su lado, en contraste, una hifa con unas cuantas NPs-Au (pequeñas manchas negras); y (c) hifas de <i>Tas</i> donde se observan diferentes tonalidades, desde muy	

oscuras hasta muy claras, que muestran la variación de las cantidades de NPs-Au incorporadas a ellas..... 115

Figura 4.9. Imágenes ópticas de las estructuras híbridas obtenidas en las soluciones coloidales de (a) Zn, (b) Au y (c) Ag. En cada imagen se ha insertado el histograma de distribución de los diámetros..... 118

Figura 4.10. Imágenes SEM representativas de las estructuras metálicas de Au obtenidas después de calcinar las estructuras híbridas. Las formas de las microestructuras fueron principalmente tubulares y planas. La imagen (h) muestra el histograma de distribución de los diámetros de las microestructuras de Au; se puede ver que estos son de alrededor de 3.9 μm . La longitud de las microestructuras es de decenas de micrómetros..... 121

Figura 4.11. Esquemas ilustrativos del autoensamble de NPs-Au en la pared celular de la hifa del hongo: (a) la PCe y sus principales constituyentes (mananos, glucanos y quitina), (b) entrada de las NPs-Au a través de los poros de la pared celular y su interacción con los constituyentes de la PCe, (c) las NPs-Au estabilizadas y desestabilizadas (por enzimas secretadas por el hongo) son retenidas y se aglomeran en la PCe y (d) enlaces de puente de hidrógeno que se pueden formar entre las moléculas (DG, AcDGo y polisacáridos) que surfactan a las NPs-Au y los constituyentes de la PCe (1. mananos, 2. glucanos y 3. quitina)..... 123

Figura 4.12. (a) Imagen SEM que muestra parte de una estructura híbrida con muy pocas NPs-Au. (b) Estructura con pocas NPs-Au que después del TT conserva residuos de la bioplantilla (señalada con la flecha blanca en la imagen insertada). (c) Microestructuras colapsadas después del TT, debido a la poca cantidad de NPs (estas hifas en microscopía óptica lucen pintadas del color del coloide). (d) Microestructuras planas obtenidas después del TT por colapso, debido a la poca cantidad de NPs; aunque en este caso la cantidad es mayor que en (c); en microscopía óptica, las estructuras híbridas correspondientes se veían oscuras. (e) Esquema de la agregación de las NPs-Au coloidales (esferas amarillas) dentro y sobre la PCe de la hifa (e1 y e2); después de la extracción de la bioplantilla (e3), se forman los microtubos por la interconexión de las NPs-Au (coalescencia de las NPs)..... 127

Figura 4.13. (a) Mapeo elemental de una parte de una microestructura tubular de Au (imagen insertada). (b) Espectro EDS de la misma estructura de Au..... 128

Figura 4.14. Imagen óptica de las estructuras híbridas de Zn. El eje oscuro de las hifas indica la presencia de NPs-Zn en el citoplasma..... 128

Figura 4.15. Imágenes ópticas de estructuras híbridas de Zn. La fragmentación ocurre durante la colocación de la muestra en el portaobjetos e indica la fragilidad a lo largo de las estructuras (hifas)..... 129

Figura 4.16. Espectros (a) Raman y (b) SERS de (I) AZM, (II) R6G, (III) NMO y (IV) DG. Los espectros SERS presentados ((I-IV)b) se obtuvieron con las moléculas del

analito presentes sobre los microtubos de Au. En el espectro Raman normal de los analitos ((I-IV)a) se observa únicamente el pico asociado al modo vibracional del Si de bulto (520 cm^{-1}). En cada imagen se ha insertado un esquema de la molécula analito correspondiente..... 132

Figura 4.17. Espectros SERS de las soluciones de (I) AZM y (II) R6G obtenidos (a) del sustrato de silicio sin microestructura y (b y c) de dos diferentes puntos de la microestructura de Au (en la imagen insertada se muestran los puntos donde fueron realizadas las mediciones SERS)..... 133

Figura 4.18. Espectros SERS de la solución de AZM a diferentes concentraciones: (a) 1 ppm ($3.12\text{ }\mu\text{M}$), (b) 0.5 ppm ($1.5\text{ }\mu\text{M}$), (c) 0.05 ppm ($0.1\text{ }\mu\text{M}$) y (d) 0.01 ppm ($0.03\text{ }\mu\text{M}$). Siendo 0.05 ppm la concentración mínima para la que se obtiene una señal detectable..... 133

Índice de tablas

Tabla 2.1. Componentes de la pared celular de mayor presencia del grupo de los Ascomicota.....	57
Tabla 2.1. Tabla de los macro y micronutrientes minerales esenciales para los hongos.....	59
Tabla 2.3. Características y requerimientos generales de los hongos usados en el presente trabajo.....	66
Tabla 3.1. Tamaño promedio de las NPs obtenido a partir de un ajuste gaussiano a los histogramas de distribución de tamaños de las imágenes TEM (obtenidas después de 10 días de la preparación de las muestras).....	78
Tabla 4.1. Características generales de las estructuras híbridas (<i>Tas</i> /NPs-M) obtenidas en soluciones coloidales de NPs de los tres metales.....	118
Tabla 4.2. Valores del FA promedio calculados para los analitos AZM, R6G, NMO y DG.....	132

Capítulo 1

Introducción y revisión del estado del arte

La nanociencia y la nanotecnología tratan del estudio, la síntesis, la manipulación, la caracterización y la aplicación de los nanomateriales. En estas actividades convergen muchos campos de la ciencias naturales como la química, la física, la biología y, además, las ciencias de materiales, la medicina y las ingenierías, lo que convierte la nanociencia y la nanotecnología en áreas multidisciplinarias [1, 2]. Los nanomateriales o nanoestructuras son materiales de tamaño nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$); por eso, a menudo, se hace referencia a la nanotecnología como la disciplina que trata de los materiales que tienen al menos una de sus dimensiones de tamaño comprendido dentro del intervalo de 1 a 100 nm (según la *Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos de América, o INN-2004, por sus siglas en inglés*) [3, 4]. Desde este punto de vista, las nanoestructuras pueden entonces clasificarse de acuerdo al número de sus dimensiones que se encuentren fuera del intervalo mencionado. Así, las nanoestructuras 0D son las nanopartículas (NPs) y los puntos cuánticos, ninguna de cuyas dimensiones pertenece a la escala macroscópica. Las nanoestructuras 1D son los nanoalambres y los nanotubos; las películas delgadas son 2D y

los nanocompositos son 3D [1-3]. Los nanomateriales han resultado ser muy atractivos debido a que por su tamaño presentan nuevas propiedades fisicoquímicas, diferentes a las de sus contrapartes macroscópicas. Estas propiedades pueden ser sintonizadas considerablemente ajustando el tamaño y la forma de los nanomateriales y, gracias a ello, estos materiales tienen variadas aplicaciones tecnológicas. El confinamiento cuántico y una mayor razón de área a volumen son los principales responsables de las distintas propiedades de los nanomateriales [1-3, 5-8].

Aunque la nanociencia y la nanotecnología son temas de investigación científica relativamente recientes, algunas de las ideas y conceptos centrales relevantes han sido establecidos a través de un largo periodo de tiempo. En 1959, en una conferencia titulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, el físico Richard Feynman describió un proceso por medio del cual los científicos podrían llegar a manipular átomos y moléculas individualmente y a fabricar artefactos con una precisión de unos cuantos átomos [1-3]. En 1947, el científico japonés Norio Taniguchi empleó por primera vez el término nanotecnología, definiéndola principalmente como el procesado, separación, consolidación y formación de materiales átomo por átomo, molécula por molécula [1, 3]. En 1980, K. Eric Drexler desarrolló y popularizó el concepto de nanotecnología e inauguró el campo de la *nanotecnología molecular* con la publicación del libro “*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*” [1, 3]. Pero no fue sino hasta la invención del microscopio de efecto túnel (STM, por las siglas de su nombre en inglés: *Scanning Tunneling Microscope*) en 1981 y el inicio de la ciencia de cúmulos (*clusters*) que la nanotecnología surge como un nuevo campo de investigación científica [1-3]. Esto posibilitó la manipulación, caracterización y síntesis de nanomateriales y, con el paso del tiempo, se han desarrollado

estrategias de síntesis para producir diferentes tipos de nanoestructuras [1-3]. En la actualidad existen dos enfoques para la fabricación de materiales nanométricos: el *top-down* y el *bottom-up* [1-3]. El enfoque *top-down* consiste en el desgaste de una muestra macroscópica de un material para su miniaturización, su reducción a dimensiones nanométricas, mientras que el enfoque *bottom-up* se centra en la construcción de materiales a partir de sus componentes atómicos o moleculares, hasta llevarlos a escalas nanométricas. Ambos enfoques dan lugar a una variedad de técnicas de síntesis, tanto físicas como químicas, para fabricar nanoestructuras de cualquier tipo (0D, 1D, 2D y 3D) y controlar factores como tamaño, forma y estructura [1-3]. Los métodos físicos más usados para sintetizar nanomateriales son los siguientes: la técnica de deposición física de vapor (*PVD*, por las siglas de su nombre en inglés *Physical Vapor Deposition*), la técnica de pulverización catódica (*sputtering*) y los procesos de litografía, ablación y deposición con láser pulsado (*PLD*, por las siglas de su nombre en inglés: *Pulsed Laser Deposition*) [1-3, 6, 9-15]. Por otra parte, los métodos químicos más utilizados son los siguientes: deposición electroquímica, reducción química de sales metálicas, pirólisis por rocío (*spray pyrolysis*), técnicas hidrotérmica y solvotérmica, co-precipitación, técnica de sol-gel y deposición química en fase de vapor (*CVD*, por las siglas de su nombre en inglés: *Chemical Vapor Deposition*) [1-3, 6, 8, 9, 16-18]. Con estas técnicas de síntesis se han obtenido una gran variedad de nanoestructuras de diferentes materiales, como Au, Ag, Cu, Pt, Al, Pd, GaAs, Zn, ZnO, InO₂, SnO₂, TiO₂, WO₂, CdS, CdSe, SnS, CuS, Fe₂O₃, etc., que son usadas en la fabricación de sistemas de conversión y almacenamiento de energía, de catalizadores, de sensores y de dispositivos electrónicos, entre otros [1-3, 8, 9, 15, 17]. A pesar de que los métodos físicos sirven para sintetizar una gran variedad de nanoestructuras y son más ecológicos, no tienen mucha versatilidad en la síntesis de nanomateriales. Con ellos,

además, la homogeneidad química a nivel molecular y parámetros como el tamaño, la composición, la cristalinidad y la morfología son difíciles de controlar, a diferencia de lo que ocurre con los métodos químicos. Los materiales sintetizados por métodos químicos tienen características tecnológicamente más importantes (como uniformidad de tamaño y forma) que los hacen candidatos más prometedores para una amplia gama de aplicaciones potenciales en los sectores de optoelectrónica, medicina, biología, catálisis, alimentos, cosméticos, producción y almacenamiento de energía y farmacéutica [1-3, 8, 9, 15, 17, 19-25].

Sin embargo, los métodos químicos de síntesis generalmente involucran reactivos tóxicos o perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. Esto ha hecho surgir una creciente preocupación que promueve la búsqueda de una alternativa de síntesis *verde*, es decir, más ecológica y ambientalmente viable. Una alternativa que tiene estas características se presenta dentro del nuevo campo denominado *bionanotecnología* y consiste en utilizar la técnica de *biosíntesis*. Esta técnica intenta reducir o eliminar el uso de materiales tóxicos o dañinos en los procesos de síntesis utilizando, en lugar de ellos, materiales biológicos que no deriven en un riesgo para la salud de las personas [26]. Dentro de este tipo de enfoque, uno de los métodos químicos más versátiles, que se ha convertido en una de las mejores alternativas para la biosíntesis de metales, es el método de reducción química de sales metálicas (RqSM) para sintetizar soluciones coloidales. Este método es especialmente útil en la biosíntesis de nanopartículas metálicas (NPs-M). La síntesis de NPs-M es un área de la nanotecnología muy activa ya que las NPs-M están entre las estructuras más estudiadas, sintetizadas y exploradas; tienen múltiples aplicaciones tecnológicas actuales y sus posibles aplicaciones futuras prometen ser de gran impacto [1, 8, 25-27].

La bionanotecnología es, entonces, una rama de la nanotecnología que ha surgido, entre otras cosas, como una alternativa para biosintetizar nanomateriales en forma más limpia, mediante procesos seguros que no son tóxicos ni perjudiciales para los seres vivos y que, además, son más simples y más baratos. Las nanopartículas biosintetizadas no sólo tienen la misma calidad que las sintetizadas por cualquier otro método químico, sino, además, pueden también poseer otra de las bondades que ofrece la bionanotecnología: la *biocompatibilidad*. Es decir, las moléculas adsorbidas en la superficie de las NPs-M no degradan las propiedades ni interfieren en el comportamiento del medio biológico en que se introduzcan las NPs, debido a que los reactivos usados en la síntesis no son tóxicos; lo que hace que las NPs así sintetizadas sean las mejores candidatas para aplicaciones reales en el campo de la biomedicina. Otro aporte importante de la bionanotecnología es la posibilidad de usar sistemas biológicos como *bioplantillas* o soportes biológicos en la construcción de estructuras complejas a partir de bloques más pequeños. Algunos ejemplos de estos sistemas son las bacterias, los hongos y los virus [28-30]. En los últimos años ha aumentado el interés en el uso de bioplantillas para obtener arreglos (1D, 2D y 3D) de nanopartículas, con la intención de aumentar aún más las respuestas de estos materiales y sus aplicaciones. El uso de bioplantillas incluye las mismas ventajas que brinda la biosíntesis (procesos seguros, no tóxicos, baratos, etc.) y aprovecha además las características y procesos naturales propios y únicos de los sistemas biológicos para fabricar así estructuras inorgánicas extraordinarias, uniformes y reproducibles. Así, la bionanotecnología, con la aplicación de la biosíntesis, la biocompatibilidad resultante y el uso de bioplantillas, ofrece la posibilidad de obtener bionanomateriales o biomicromateriales potencialmente funcionales para diferentes aplicaciones.

Los nanomateriales metálicos han llegado a ser en la actualidad unos de los materiales más atractivos, no solo por las propiedades que poseen los metales a escala macroscópica, sino porque a escala nanométrica exhiben nuevas propiedades. Las NPs-M tienen una gran ventaja con respecto a sus contrapartes macroscópicas debido al fenómeno de resonancia del plasmón superficial (SPR, por las siglas de su nombre en inglés: *Surface Plasmon Resonance*) que influye de manera preponderante en las propiedades que presentan estos nanomateriales. Gracias a las propiedades asociadas a los plasmones de superficie, como la absorción de la luz en la gama del visible y la sensibilidad del fenómeno a la presencia de moléculas de otros materiales adsorbidas en la superficie de las nanopartículas, las NPs-M tienen aplicaciones potenciales como biosensores químicos y biológicos, en dispositivos de diagnóstico por imágenes, en dispositivos plasmónicos y en la detección temprana de enfermedades como el cáncer y en sus tratamientos. Por lo anterior, las NPs-M están consideradas como bloques de construcción de los dispositivos de la próxima generación para las aplicaciones mencionadas. El auto-ensamble de NPs-M constituye una opción real para tales aplicaciones ya que, si bien, el fenómeno de SPR se observa en una NP, este no es tan intenso como el que presenta un arreglo de NPs-M. El trabajo presentado en esta tesis pertenece al campo de la bionanotecnología y se suma a los esfuerzos de las investigaciones científicas para desarrollar nuevos métodos de fabricación de materiales amigables con el medio ambiente y la salud humana. Además, las nanoestructuras fabricadas con estos métodos son biocompatibles. Bajo esta perspectiva, el presente trabajo expone la biosíntesis de NPs metálicas y su uso como bloques de construcción para la fabricación de microestructuras metálicas 1D. Ambas partes del trabajo fueron realizadas mediante procesos bottom-up.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es fabricar, utilizando hongos como plantillas biológicas vivas, microestructuras metálicas unidimensionales (1D) para emplearlas como sensores biológicos y químicos.

Las etapas de desarrollo del trabajo, así como los procesos seguidos, los análisis realizados y los resultados obtenidos, están registrados en el cuerpo de esta tesis. La tesis está dividida en cinco capítulos. La introducción y la revisión del estado del arte constituyen el primer capítulo. En el segundo capítulo, “Bioplantillas”, se describen las características fisiológicas y morfológicas de las bioplantillas utilizadas; se habla principalmente de los parámetros de crecimiento de los hongos (nutrientes, pH y temperatura) y de los medios de cultivo, con especial interés en los hongos *Trichoderma asperrelum* y *Aspergillus sidowii* que fueron los que se usaron como bioplantillas. Se describen los procesos de manipulación e inoculación.

El tercer capítulo, “Biosíntesis de nanopartículas metálicas”, comienza con una breve descripción del método coloidal utilizado para la biosíntesis de las nanopartículas metálicas de Au, Ag y Zn; se expone el análisis de los resultados obtenidos y su discusión, proponiendo los mecanismos de la reducción de sales metálicas y del proceso de estabilización de las NPs.

El cuarto capítulo, “Fabricación de estructuras metálicas 1D y su utilización como sustratos SERS”, describe los resultados y el mecanismo de formación de las estructuras híbridas y de los procesos involucrados en la extracción del material orgánico. Al final del capítulo se presentan los resultados y el análisis de las microestructuras metálicas obtenidas y su aplicación como eficientes sustratos SERS, es decir, como biosensores químicos y

biológicos, demostrando su eficiencia para detectar moléculas de azul de metileno, rodamina, naranja de metilo y D-glucosa. Finalmente, los logros obtenidos en esta investigación y su impacto se presentan en el capítulo de conclusiones.

1. Antecedentes

1.1. Síntesis coloidal de nanopartículas metálicas

Desde hace algunas décadas, las NPs-M han sido estudiadas extensamente debido a las nuevas propiedades fisicoquímicas que presentan y esto ha dado lugar a un área muy activa de investigación dentro de la nanotecnología. Las nuevas propiedades de las NPs-M están asociadas a diversos factores: la gran razón de área a volumen, el confinamiento espacial de los portadores de carga, sus altas energías superficiales, y la baja concentración de defectos [1-3,6-8, 16, 25]. Así, el bajo punto de fusión está asociado a la alta energía superficial [1, 6-8, 31]; el aumento en la fuerza mecánica, a la reducción de defectos [1, 6-8, 25, 32]; el cambio en las propiedades ópticas, al confinamiento espacial (que incrementa el espaciamiento entre los niveles de energía) y a la resonancia del plasmón superficial [1, 7, 8, 25, 27, 33]. Estas propiedades pueden aparecer y ser modificadas dependiendo de características como el tamaño, la morfología y la estructura cristalina de las NPs-M [1, 6-8, 34]. Debido a esto, las NPs-M son aprovechadas para una gran diversidad de aplicaciones en los sectores de electrónica, óptica, catálisis, cosméticos, recubrimientos, empaquetamiento, antimicrobianos, antivirales, biosensores, biomarcadores, etc. [1, 2, 8, 16, 28, 35-45] y actualmente, son uno de los materiales más explorados para aplicaciones biomédicas, como diagnóstico en etapa temprana de enfermedades, radioterapia de

tumores, terapia de genes, detección de tumores, portadores de fármacos, contraste de imagen, etc. [23, 30, 45-51].

Tradicionalmente, la técnica utilizada para la fabricación de NPs-M es la síntesis coloidal por el método de RqSM. Esta técnica consiste en el crecimiento de NPs en un medio líquido que contiene reactivos precursores del metal (sal metálica), reactivos de reducción (agentes reductores), reactivos de estabilización (agentes estabilizadores) y algunos otros químicos para promover y controlar las reacciones de reducción, la nucleación inicial y el posterior crecimiento o agregación de los núcleos; el solvente puede ser agua o algún solvente orgánico [1, 6, 7, 52, 53]. El agente reductor lleva a cabo la reducción química (mediante el proceso de reacción redox) de las sales metálicas o iones metálicos a átomos neutros. Después, los átomos metálicos comienzan a unirse (nucleación) y crecen para formar partículas sólidas de tamaño nanométrico (ver Fig. 1.1). El agente estabilizador interacciona y se enlaza o se adsorbe en la superficie de las nanopartículas para detener su crecimiento y aglomeración subsecuente, dando estabilidad al sistema coloidal. El enlace entre la superficie de la partícula y el agente estabilizador se debe a interacción electrostática, a quimisorción o a interacciones hidrofóbicas [1, 7, 53, 54]. El resultado depende de la naturaleza del surfactante, del solvente y de parámetros como el pH y la temperatura. Las interacciones más frecuentes que evitan la aglomeración, es decir, que dan lugar a la estabilización del sistema coloidal, son (ver Fig. 1.2) las interacciones electrostáticas, las estéricas (polímeros) y la combinación de estas (ciertos polímeros o dendrímeros) [1, 7, 53, 54].

Los métodos pioneros y los más utilizados en la actualidad para sintetizar NPs-M en forma coloidal fueron establecidos por diferentes grupos de investigadores a lo largo de seis

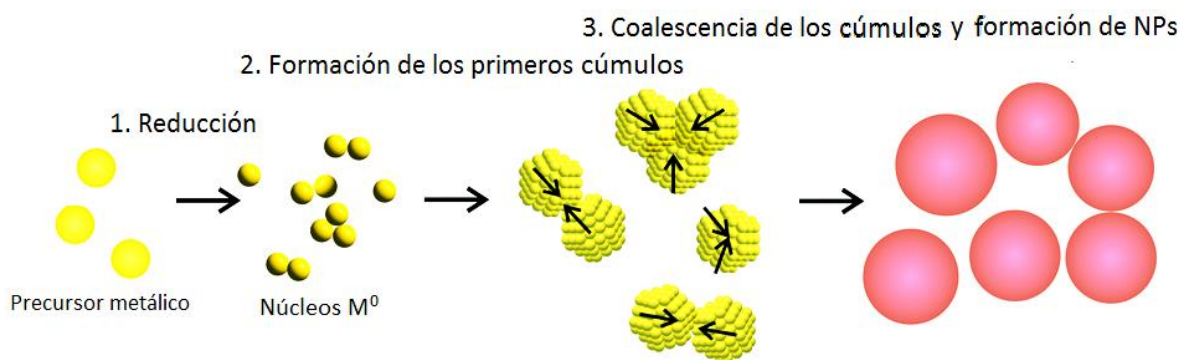


Figura 1.1. Esquema del crecimiento de las nanopartículas y su coalescencia. M^0 hace referencia a cualquier átomo metálico neutro [52].

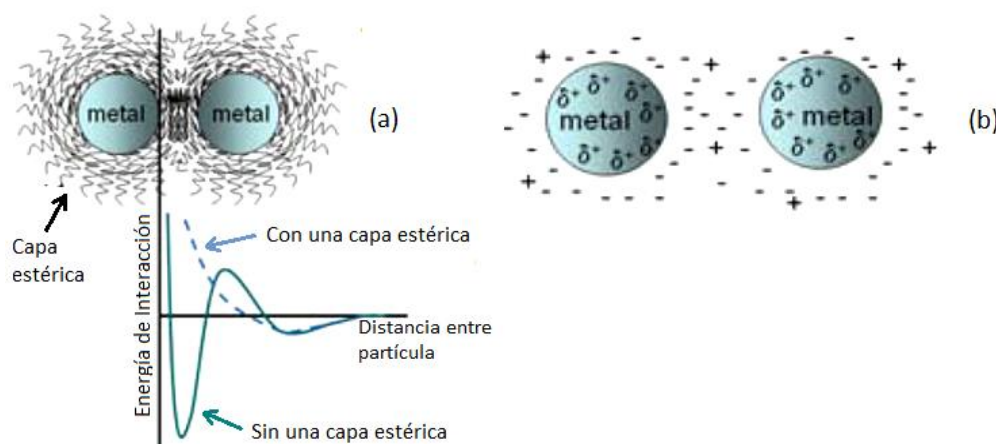


Figura 1.2. Esquema de estrategias de estabilización de NPs-M. Interacciones de tipo (a) estérico y (b) electrostático [55].

décadas. El primero fue establecido por Turkevich en 1951; en él se utilizó citrato de sodio como reductor de iones de Au (ácido cloroáurico, HAuCl_4 , como precursor) en un medio acuoso a su temperatura de ebullición ($95\text{-}100^\circ\text{C}$) y se obtuvieron NPs-Au de 20 nm de diámetro [56]. Basándose en el método de Turkevich y variando la razón molar de reductor a precursor de oro (citrato trisódico/ HAuCl_4), Frens logró en 1973 obtener NPs-Au de tamaños comprendidos entre 16 y 147 nm [57]. En 1993, Mulvaney y Giersig reportaron la síntesis de NPs-Au de tamaños en el rango de 3.5 a 28.5 nm utilizando alcanotioles como estabilizadores [58]. Esto mostró la posibilidad de utilizar tioles de diferentes longitudes de

cadena para obtener NPs-Au de diversos tamaños. En 1994, Brust y Schiffrin reportaron un método de síntesis de NPs-Au que tuvo un impacto considerable en menos de una década. Con este método, a temperatura ambiente, se obtenían NPs-Au térmicamente estables, monodispersas y de tamaño controlado comprendido entre 1.5 y 5.2 nm, utilizando ligandos tioles como surfactantes y borohidruro de sodio (NaBH_4) como reductor [59]. Brust et al. hicieron una extensión de este método usando p-mercaptofenol como estabilizador. Hasta el momento, diversos tipos de NPs-M de Au, Pt, Ag, Pd, Cu, Ni y Fe, de diversas formas y características (NPs bimetálicas, núcleo coraza, tipo compositas, etc) han sido sintetizadas mediante métodos que son modificaciones de los mencionados arriba, utilizando los mismos agentes (tioles, NaBH_4 , citrato de sodio) [41, 60-67] pero modificando o variando las cantidades de estabilizador o reductor, la temperatura, el pH o combinaciones de estos; también se han sustituido algunos de los reductores y estabilizadores mencionados [68-72]. Las NPs-M obtenidas con estos agentes tienen una alta cristalinidad y son monodispersas; pero, sobre todo, se puede tener un control más preciso de su tamaño y forma esférica, además de que son altamente estables.

Los reactivos mencionados arriba son sin duda efectivos, pero son también perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente, es decir, no son reactivos químicos *verdes* debido a sus efectos dañinos. Por ejemplo, el borohidruro de sodio (NaBH_4) es corrosivo y conduce a la generación de hidrógeno y diborano, que son altamente inflamables. Los tioles alifáticos y aromáticos producen efectos hemolíticos en animales, los aminotioles inducen efectos de citotoxicidad y los radicales tiilo [73] son responsables de iniciar el daño tisular provocado por tioles y disulfuros. Las aminas, por otro lado, son cáusticas y causan irritación severa en la piel, los ojos y las membranas mucosas; incluso, a concentraciones

moderadas, los tioles y las aminas pueden ser tóxicos [73]. Por todo esto, la opción de biosintetizar NPs-M, sustituyendo estos agentes reductores y estabilizadores tóxicos por agentes de tipo biológico o por productos naturales, nos permite eliminar los riesgos derivados del uso de reactivos tóxicos.

En la siguiente sección se revisa la revisión bibliográfica de la investigación sobre biosíntesis de NPs-M y las entidades biológicas responsables de su formación y/o estabilización.

1.2. Biosíntesis de nanopartículas metálicas

En los primeros intentos de biosíntesis de NPs-M se usaron extractos de plantas, como en el trabajo reportado en 2001 por Gardea-Torresdey. Ellos sintetizaron nanopartículas esféricas de Au, de alta cristalinidad y de 2 a 20 nm de diámetro, utilizando extracto de alfalfa [74]. Este trabajo dio paso a publicaciones similares que reportaban el uso de diferentes plantas. Por ejemplo, Vilchis-Nestor et al. [75] usaron extracto de *Camelia sinensis* en la síntesis de partículas cuasi-esféricas de Au y Ag de tamaño de alrededor de 40 nm, Das and Velusamy usaron extracto de *Sesbania grandiflora* [76] en la síntesis de partículas cuasi-esféricas de Au de tamaños comprendidos entre 7 y 34 nm, Silvia-de-Hoyos y colaboradores [77] usaron *Opuntia ficus* en la biosíntesis de NPs-Ag de diámetro de alrededor de 23 nm. También, Saxena et al. [78] usaron *Ficus benghalensis* en la síntesis de partículas cuasi-esféricas de Ag de 16 nm de diámetro (ver Fig. 1.3). Entre otros ejemplos, se puede mencionar también el uso de *Cacumen Platycladi* para sintetizar partículas de Pt de alrededor de 2.4 nm de diámetro [79], y de *Annona squamosa*, utilizada por Kalaiselvi et al., para la síntesis de NPs-Pd de alrededor de 80 nm de diámetro [80]. También, los

constituyentes y productos de las plantas, como los frutos (fruta y vegetales), las raíces, los tubérculos, los tallos y las semillas, han sido utilizados para la biosíntesis de NPs-M [81-85]. La referencia 85 contiene listas de otros extractos de plantas usados con resultados similares a los expuestos arriba o, también, con la obtención de estructuras de formas diferentes, siendo todas de tamaños comprendidos entre 2 y 200 nm. Asimismo, se ha explorado el uso de polvos comerciales de plantas o de algún constituyente específico, como los polvos de extracto de maíz o de arroz, el almidón, la glucosa de maíz, etc. Se ha reportado que las NPs-M sintetizadas con polvos comerciales son de mayor tamaño (de alrededor de 45 nm) que las preparadas directamente con extractos de plantas (alrededor de 25 nm). Esto destaca el papel de los fitoquímicos de extractos de plantas, cuya cantidad y poder de reducción y/o estabilización disminuyen en gran medida cuando están presentes en polvos comerciales [73, 86].

Muchos de los trabajos mencionados señalan que las fitomoléculas, como los compuestos polifenólicos, los flavonoides, los hidratos de carbono, los polisacáridos, las proteínas, las vitaminas, etc., son las responsables de los procesos de reducción y estabilización, aunque no se conocen con certeza las responsables directas de la reducción de las sales metálicas y la estabilización de las nanopartículas formadas, ni los mecanismos de reducción y estabilización [73-85].

Las plantas no han sido la única opción para sintetizar NPs-M; el uso de microorganismos como hongos y bacterias se ha sumado a los procesos de biosíntesis y se ha reportado que la síntesis puede ocurrir de forma intracelular (cuando las NPs-M se encuentran mayormente dentro de las células microbianas) y extracelular (cuando las NPs-M se

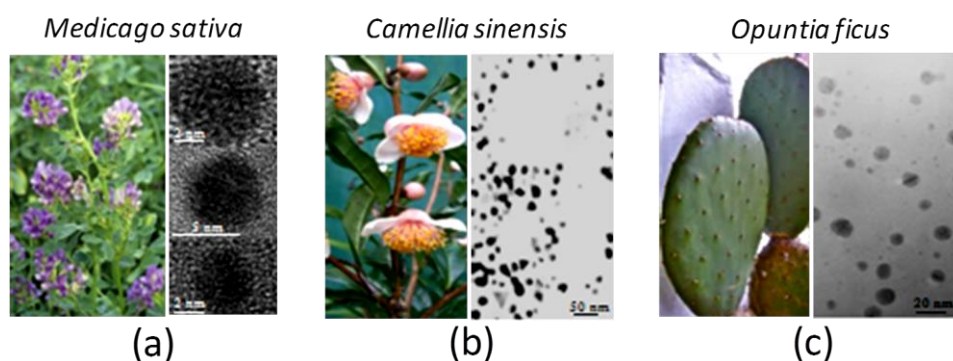


Figura 1.3. Imágenes de algunas de las plantas utilizadas en las biosíntesis de NPs-M; (a) *Medicago sativa*, utilizada para la síntesis de NPs de Au (a la derecha aparece una imagen TEM de las NPs [74]); (b) *Camellia sinensis*, usada para la biosíntesis de NPs de Au (a la derecha se muestra una imagen SEM de las NPs obtenidas [75]); y (c) *Opuntia ficus*, utilizada para sintetizar NPs-Ag (a la derecha aparece una imagen TEM de las NPs obtenidas[77]).

encuentran suspendidas en la solución) [87-89]. Con el uso de diferentes tipos de bacterias se han producido NPs de Ag y Au cuasi-esférica, esféricas, triangulares, hexagonales o piramidales de 2 a 200 nm de tamaño con buena cristalinidad [87-89], características que dependen de factores como el pH, la concentración de reactivos y la temperatura de la reacción. Por ejemplo, la bacteria *Brevibacterium casei* fue utilizada para sintetizar NPs de Au y Ag cuasi-esféricas, cristalinas, de tamaños de 10 a 50 nm (ambas NPs), de forma extracelular, por Kalishwaralal y colaboradores [90]. La *Pseudomonas aeruginosa* fue utilizada por Hussein et al. [91] para fabricar NPs-Au cuasi-esféricas, de tamaños de 15 a 30 nm. He et al. reportaron el uso de *Rhodopseudomonas capsulata* para obtener NPs-Au esféricas y cristalinas, de 10 a 20 nm de diámetro [92]. De la misma forma se han empleado *Stenotrophomonas maltophilia* (NPs-Au de alrededor de 40 nm) [93], *Desulfovibrio desulfuricans* (NPs-Pd de alrededor de 50 nm) [94] y *Shewanella oneidensis* (NPs-Au de 2 a 50 nm) [95], entre otras (Fig. 1.4). Podemos ver en el artículo de Narayanan et al. [89] una lista de las diversas bacterias que se han utilizado para este fin. Igualmente se han usado hongos filamentosos y levaduriformes para sintetizar NPs de Au y Ag cuasi-

esféricas, esféricas, triangulares, hexagonales o pentagonales, todas cristalinas, de tamaños comprendidos entre 5 y 200 nm [90-92, 96-98]. Otros organismos, como las algas, también fueron explorados como biofabricadores de NPs de Au, Pt y Ag [88, 99, 100]. Todos estos trabajos reportan que las enzimas secretadas por los microorganismos y los constituyentes de la pared celular son los responsables de la reducción y estabilización de las NPs-M, aunque los mecanismos de tales procesos no se conocen con certeza.

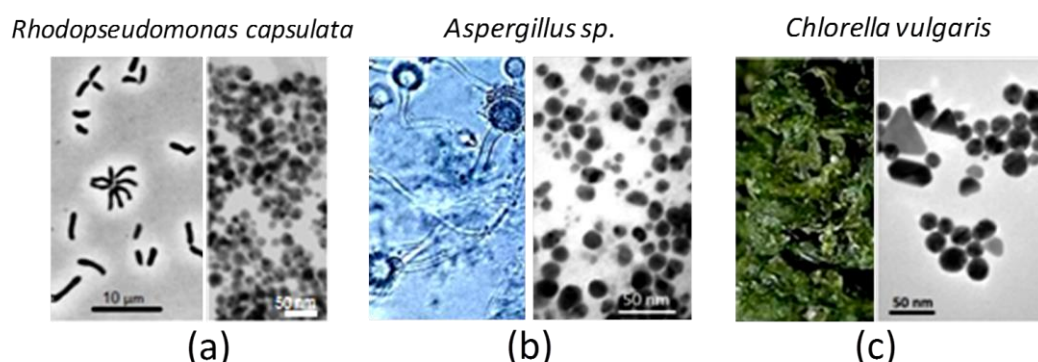


Figura 1.4. Imágenes de algunos microorganismos utilizados para biosíntesis de NPs-M: (a) Bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*, utilizada para sintetizar NPs de Au y Ag (a la derecha se muestra una imagen TEM de las NPs de Au [92]); (b) *Aspergillus sp.*, hongo utilizado para la síntesis de NPs de Ag (a la derecha se muestra una imagen SEM las NPs obtenidas [88]); (c) Alga *Chlorella vulgaris*, utilizada para sintetizar NPs y nanoplatos de Au (a la derecha se muestran las NPs de Au [100]).

Aunque la biosíntesis de NPs-M es relativamente nueva, los investigadores han comenzado a explorar sus aplicaciones, no solamente en aquellas áreas donde usualmente las NPs-M son usualmente aplicadas, como en catálisis, óptica, electrónica, farmacéutica, cosméticos, producción y almacenamiento de energía, etc. [85, 101-103], sino en aplicaciones en el campo de la medicina (Nanomedicina), ya que las NPs-M, al estar rodeadas por moléculas surfactantes que no son tóxicas o agresivas para un sistema biológico, pueden ser biocompatibles con tales sistemas. En la actualidad se explora la aplicación de las NPs-M biosintetizadas como portadores de fármacos, biosensores químicos y biológicos, potenciadores del sistema olfativo o agentes antibacteriales o antivirales; y en tratamientos

y diagnósticos de enfermedades como el cáncer y los desórdenes neuronales, en terapia genética, en análisis de ADN, y en la adquisición de imágenes de resonancia magnética y de imágenes de contraste, etc. [84, 103-113]. Debido a la biocompatibilidad de las NPs-M, estas pueden circular en el torrente sanguíneo sin ser detectadas por el sistema inmunológico o causar daño [112], pueden atravesar la membrana plasmática de manera más fácil [112] sin dañar células sanas [107] y llegar al material citoplasmático, ya que ciertas proteínas transportadoras (por ejemplo GLUT1) de la membrana plasmática se enlazan con las moléculas surfactantes adheridas a las NPs-M para transportarlas hasta el material citoplasmático [104, 108, 112]. Se ha reportado, además, que las NPs-M surfactadas por glucosa tienen una mejor selectividad para dirigirse a células cancerígenas (y así no dañar células sanas), pues se sabe que algunos cánceres adsorben más cantidad de glucosa [113]. Las NPs-M sintetizadas por métodos químicos, debido a las moléculas surfactantes adsorbidas en su superficie, tienden a agregarse en las células sanguíneas. Su baja compatibilidad les dificulta atravesar la membrana plasmática y pueden causar citotoxicidad [110, 112].

A pesar de que las ventajas de la fabricación de NPs-M por biosíntesis han sido bien demostradas y a pesar de los beneficios de las NPs-M obtenidas y su amplia gama de aplicaciones, la biosíntesis no ha proporcionado un medio confiable para dirigir o controlar la forma, el tamaño y la monodispersidad de las NPs. Hay que recordar que estos son parámetros importantes que influyen en las propiedades de las NPs y, por lo tanto, en sus aplicaciones. El control de los parámetros sigue siendo también un problema de investigación en curso tanto en los métodos físicos como en los químicos tradicionalmente

utilizados por décadas. En este aspecto, la biosíntesis tiene la considerable ventaja de encontrarse todavía en sus primeras etapas de desarrollo.

1.3 Dispersión Raman amplificada por superficies (SERS)

La excitación de plasmones superficiales localizados, uno de los fenómenos importantes que ocurren en las nanoestructuras metálicas, ha dado lugar a la aparición de nuevas técnicas espectroscópicas. Un caso muy importante, que genera un esfuerzo mundial motivado por sus aplicaciones potenciales en diversos campos, es la espectroscopia de dispersión Raman amplificada por superficies o SERS (sigla del inglés *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) [114-116]. La característica principal de SERS es el aumento o amplificación de la respuesta Raman normal de las moléculas del analito mediante el uso de sustratos formados por nanoestructuras plasmónicas (Ver Fig. 1.5) [116-119]. Para cuantificar el aumento de la respuesta Raman, se puede usar el parámetro crítico denominado factor de aumento (FA) que se define como la razón entre la intensidad por molécula medida en SERS y la intensidad por molécula medida en Raman normal (sin utilizar algún sustrato SERS). Mientras mayor sea la respuesta SERS, mayor es el valor de FA. La respuesta SERS puede variar de acuerdo a las características de las estructuras plasmónicas (material, tamaño, forma, etc.) usadas como sustrato y a la concentración y la sección transversal de dispersión del analito, entre otras [119-121].

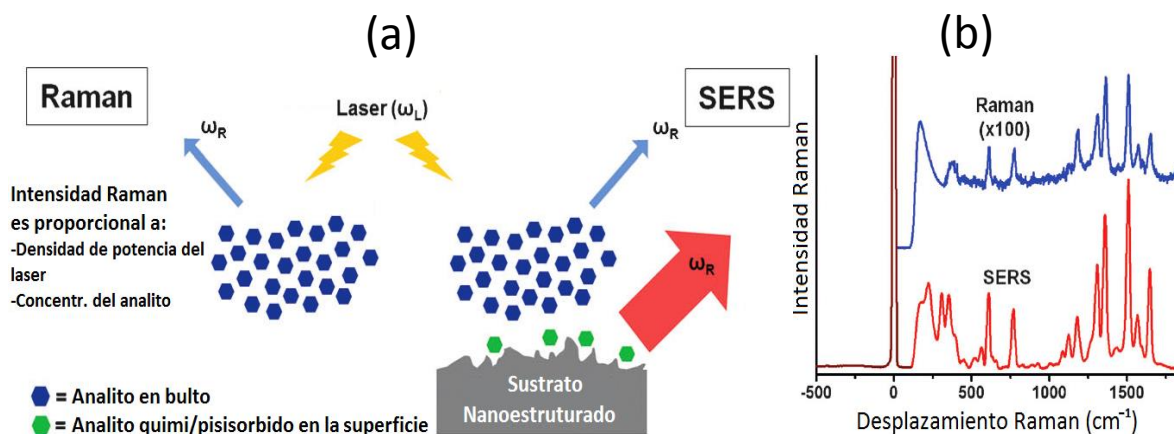


Figura 1.5. (a) Esquema comparativo de la dispersión Raman y de SERS. (b) Espectro SERS de la rodamina 6G en coloides de Ag (línea roja) y el espectro Raman normal de la misma molécula en agua (línea azul) multiplicado por un factor de 100 [117].

Más de la mitad de las publicaciones relacionadas con SERS en los últimos cuatro años tratan del desarrollo, fabricación o caracterización de arreglos de estructuras plasmónicas con la intención de utilizarlos como sustratos SERS altamente activos (maximizar el FA) y, además, de la búsqueda de reproducibilidad de los sustratos. Los primeros sustratos que demostraron el efecto SERS fueron unos electrodos metálicos rugosos de Ag, usados en la detección de moléculas de piridina y amina y mostraron un factor de aumento de 10^5 a 10^6 [122-124]. Posteriormente, aparecieron diversos trabajos donde se utilizaron superficies metálicas de Au, Cu, Pt, Li, Na, Al, In y K y nanoestructuras metálicas [125].

El estudio de sustratos nanoestructurados o rugosos ha ido en aumento. Los arreglos de NPs metálicas, los cúmulos, las superficies rugosas de Au y Ag son los más explorados y los que exhiben un mayor FA, es decir, se consigue maximizar el FA por medio de la SPR de las estructuras metálicas y de la maximización del campo eléctrico local (por medio de “hotspots”).

En la literatura se ha reportado que los electrodos rugosos, películas formadas por islas, aglomeraciones de nanopartículas y nanopartículas de Ag y Au comúnmente tienen un FA

en el rango de 10^6 - 10^8 en la detección de diferentes moléculas [126-134]. Aunque existen reportes de algunos arreglos de cúmulos y nanopartículas de Au y Ag, que llegan a presentar un FA mucho más altos como el reportado por Liu y colaboradores con arreglos de nanorodillos de Ag que presentan un FA de 10^9 en los espectros de BPE (trans-1,2-bis (4-piridil) etileno) [140]. Arreglos de cúmulos de Ag, atómicamente precisos, con un FA de 10^9 en la detección de moléculas de cristal violeta [141]. Además de trabajos que mencionan altos valores de FA (10^{10} o mayor) para los llamados *sistemas de detección de una sola molécula (single molecule detection)* como el de Jackson y Halas que reportan el arreglo de nanocascarones de Au y Ag muy bien distribuidos sobre sustratos de vidrio (previamente funcionalizados) que presentan un FA de 10^{10} en la detección de moléculas de p-mercaptoanilina [142]. Nie y Emory reportaron arreglos de nanopartículas coloidales de Ag inmovilizadas sobre superficies de vidrio que exhibieron FA de 10^{14} - 10^{15} en la detección de rodamina 6G [143]. Kneipp reporta un FA del orden de 10^{14} en la detección de moléculas de cristal violeta en solución coloidal de Ag [144]. Finalmente, los arreglos de nanocubos de Au autoensamblados sobre sustratos de Au, reportados por Sisco y Murphy, presentaron un FA de 10^{12} - 10^{13} en espectros de 4-mercaptobenzoico [145].

También se han estudiado estructuras micrométricas de características morfológicas raras. Como ejemplos, se pueden mencionar las NPs-Ag sub-micrométricas, con FA de 10^5 - 10^7 en la detección de azul de metileno [137], y las estructuras fotónicas de Au en forma de luna creciente (del orden de micras) con bordes filosos de espesor menor a 10 nm, con respuestas SERS altas (FA de 10^{10}) para moléculas de rodamina 6G [138]. Otras estructuras como nanoalambres, nanobarras y estructuras compositas se han explorado como sustratos SERS y han presentado factores de aumento de alrededor de 10^6 - 10^8 en la detección de moléculas de bencenotiol [139].

Las NPs-M biosintetizadas también se han aplicado como sustratos SERS, aunque existen muy pocos reportes. Por ejemplo, para las NPs de Ag sintetizadas por medio del hongo *Neurospora crassa*, se reportó un FA de alrededor de 10^8 en la detección de moléculas de azul de metileno [146]. Aunque existen escasos reportes, también se han utilizado bioplantillas para obtener arreglos plasmónicos. Con este fin, se han usado bacterias como bioplantillas para obtener arreglos de NPs-Ag que presentaron un FA de 10^{11} en la detección de moléculas de 2-mercaptopiridina [148].

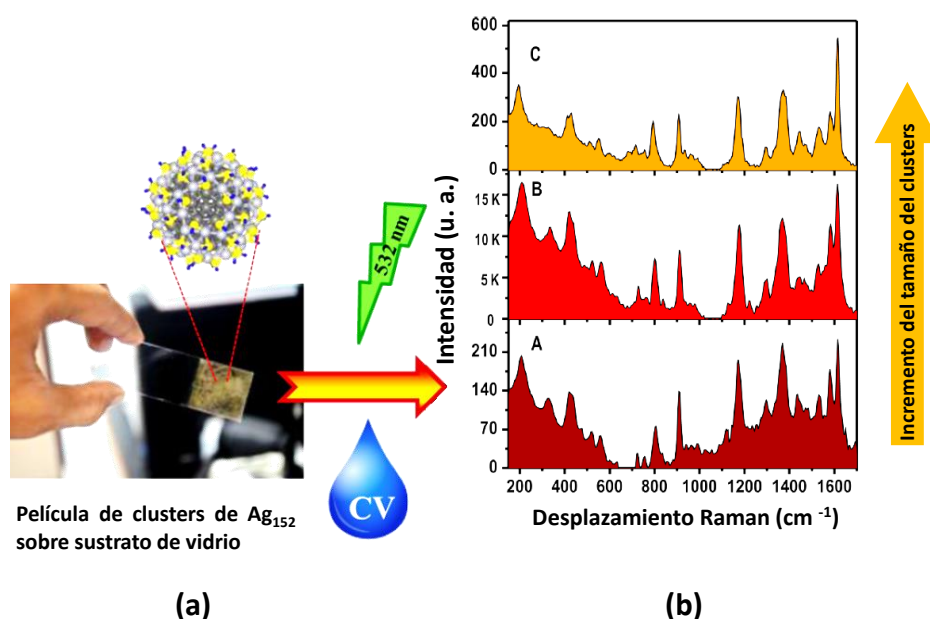


Figura 1.6. (a) Fotografía una película formada por cúmulos de Ag₁₅₂ sobre un sustrato de vidrio. Se depositaron múltiples gotas para aumentar el grosor de la película; (b) Espectros SERS comparativos de cristal violeta sobre la película: (A) Ag₅₅, (B) Ag₁₅₂ y (C) NPs-Ag de 3-4 nm. El factor de aumento máximo reportado para estos sustratos es de 10^9 [141].

Actualmente la reproducibilidad de los sustratos y de la respuesta SERS se ha logrado usando técnicas de litografía por haz de electrones (EBL, por las siglas del nombre en inglés: *Electron Beam Lithography*), que permite un control preciso de las características ópticas y morfológicas de los sustratos, estos métodos, desafortunadamente, son caros y altamente complejos, no logran factores de aumento muy altos ($FA < 10^9$) y solo pueden

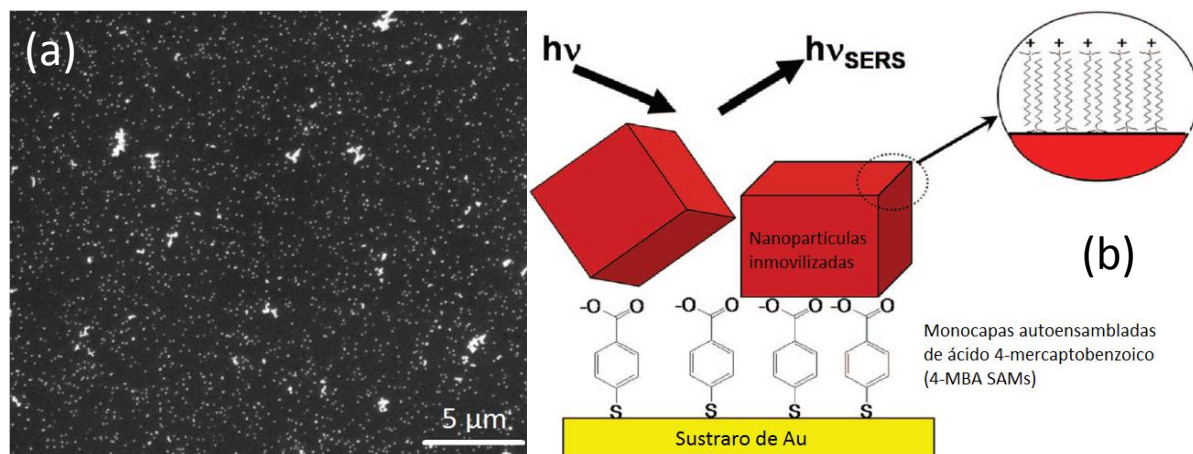


Figura 1.7. (a) Imagen SEM de nanocubos electrostáticamente inmovilizados sobre 4-MBA SAMs ($5.5/\mu\text{m}^2$). (b) Esquema de la geometría sándwich nanocubos-SAM sobre sustrato de Au. (c) Espectros de 4-MBA SAMs (1) Raman normal, (2) SERS con 5.5 cubos/ μm^2 , (3) 8.6 cubos/ μm^2 , (4) 15 cubos/ μm^2 , (5) 22 cubos/ μm^2 [145].

fabricar unas cuantas muestras a la vez [150-152].

Como puede observarse, la mayoría de las publicaciones científicas reportan un FA de hasta 10^8 y muy pocas veces se ha conseguido obtener un FA mayor de 10^9 para concentraciones de moléculas analitos que van desde 10^{-3} hasta 10^{-12} M [122-149]. Además, las técnicas mencionadas arriba que logran obtener altos FA (10^9 - 10^{15}) utilizan métodos de fabricación poco amistosos con el medio ambiente, que comprometen la salud [141, 143, 145] y son más elaborados, ya que se necesitan procesos de funcionalización para llevar a cabo el arreglo [143, 145]. Algunos de los sustratos SERS de este tipo son activos para detectar un solo tipo de molécula, dado que son arreglos de tipo sándwich, en el que la molécula queda atrapada entre dos estructuras plasmónicas [145].

1.4. Autoensamble de nanoestructuras metálicas

En este trabajo nos referiremos a “autoensamble” al proceso por el cual las nanopartículas se organizan espontáneamente debido a interacciones directas (fuerzas entre partículas) o indirectas (por medio de una plantilla o campos externos) [153]. La importancia del autoensamble radica en su utilidad para formar estructuras funcionales macroscópicas que potencian (o modifican) las propiedades físicoquímicas de los bloques que las componen de manera fácil y barata. Las nuevas macro/nano estructuras obtenidas son de gran interés ya que pueden ser ocupadas para aplicaciones en guías de ondas, en el microscopio óptico de campo cercano, en antenas, en SERS, etc. [115, 154-156].

Comúnmente, el ensamble “directo” de nanopartículas se realiza al funcionalizarlas con moléculas que se adsorben en su superficie. La interacción entre las moléculas adsorbidas en una nanopartícula con las adsorbidas en otra, por medio de fuerzas de atracción coulómbicas, provoca el autoensamble de las nanopartículas. Por ejemplo, se ha reportado el autoensamble de NPs-Au en soluciones coloidales gracias al uso de moléculas de ADN. Los arreglos macroscópicos obtenidos pueden ensamblarse o desensamblarse dependiendo de la temperatura del coloide [157]. Otro ejemplo es el autoensamble reversible de NPs-Au en solución coloidal por medio de su funcionalización con péptidos carboxilados e inducida por iones metálicos y la variación del pH de la solución (Fig. 1.8) [158]. Asimismo, se ha reportado. El autoensamble de NPs de Au y Ag para formar una película nanocomposita delgada sobre un sustrato de vidrio funcionalizado. Para ello, se ensambla primero una monocapa de NPs-Au y sobre ella se ensambla otra de NPs-Ag, y así sucesivamente. Las NPs coloidales de Au y Ag fueron funcionalizadas previamente con 4-aminotiofenol (catiónica) y 4-carboxitiofenol (aniónica), respectivamente [159]. Un ejemplo adicional es el de nanopartículas de Au encapsuladas por dodecanotiol y ensambladas para formar una

película de Langmuir–Blodgett [160]. También se han logrado obtener ensambles lineales de NPs usando principalmente moléculas de ADN, proteínas y polielectrolitos orgánicos. La primera publicación sobre este tipo de trabajos fue la de Deng et al. [161]. En ella se reporta cómo las NPs-Au estabilizadas con fosfina fueron funcionalizadas con fragmentos conjugados de ADN que se enlazan a las bases complementaria en el ADN que funcionaliza al sustrato sobre el que crece el arreglo. Siguiendo procedimientos similares, se han ensamblado arreglos lineales de NPs de Ag, Au, Pt y Pd [162-166].

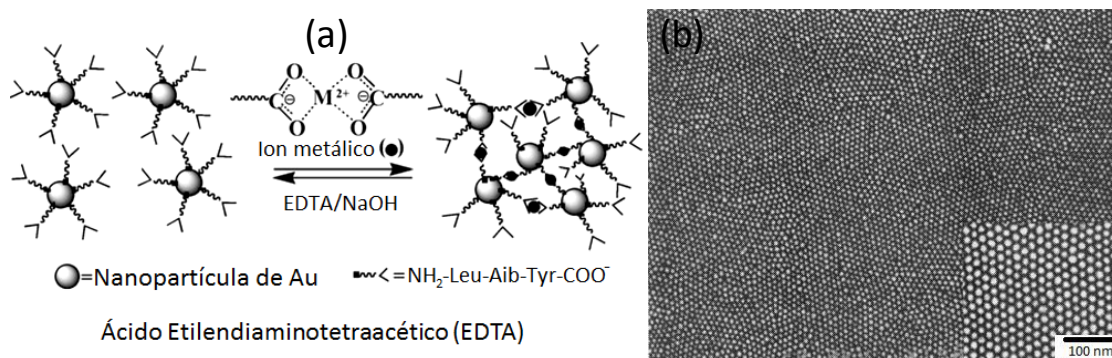


Figura 1.8. (a) Esquema de autoensamble reversible inducido por iones metálicos y el pH de la solución coloidal. Las NPs-Au están funcionalizadas con péptidos carboxilados [158]; (b) Imagen SEM de una monocapa de LB que consiste de NPs-Au encapsuladas por dodecanetiol [160].

El ensamble “indirecto” de nanopartículas se ha realizado mediante plantillas orgánicas o inorgánicas. Algunas de las plantillas que se han utilizado para el autoensamble de nanopartículas metálicas son los nanotubos de carbono, que son conocidos como plantillas duras (por su rigidez y resistencia). La estructura hueca de estos nanotubos hace que tanto la superficie exterior como la interior se pueda utilizar como plantilla para la deposición de nanopartículas. Estas plantillas se utilizan principalmente para ensamblar NPs-M en su exterior. Las estructuras tubulares de los nanotubos de carbono también fueron utilizadas en el autoensamble de NPs-Au para producir con ellas nanoalambres [167]. Así también se han obtenido nanotubos de Ag [168]. Para obtener arreglos lineales de NPs de Au se usaron

también sustratos de vidrio, gracias a una plantilla en la que se había diseñado un patrón de nanosurcos, como fue presentado por Liz-Marzan y colaboradores [169]. Adicionalmente, se han usado plantillas de óxido de aluminio anódico para obtener arreglos de nanobarras o de nanopartículas metálicas cuando estas son introducidas en los nanocanales de la plantilla [170].

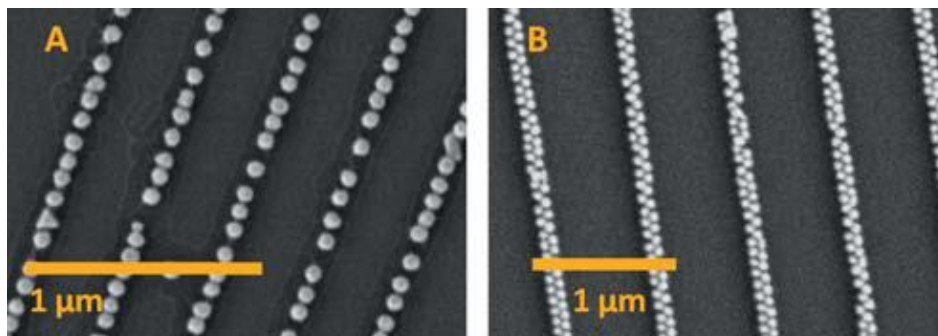


Figura 1.9. Imágenes SEM de dos arreglos de NPs-Au monodispersas en surcos, que comprenden (a) una sola línea y (b) doble línea [169].

Existe un número menor de reportes sobre plantillas orgánicas para autoensamble. Las principales bioplantillas que se han utilizado son hongos [28, 171-175], bacterias [30, 148, 176], virus [29, 177], celulosa [147, 178] y algunos tejidos (como la seda de araña) [179, 180]. Los hongos filamentosos como el *Aspergillus fumigatus*, el *A. niger* y el *A. nidulans* se han utilizado como bioplantillas para ensamblar únicamente NPs de Au y, una vez extraído el material orgánico, se han obtenido estructuras lineales (tubulares o colapsadas) de Au de orden micrométrico [20-23, 28, 171, 172]. Otros hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium* y el *Neurospora crassa* se han utilizado para ensamblar NPs-Au con resultados similares a los de los casos anteriores [174, 175]. Las bacterias *Streptococcus thermophilus* se han usado como bioplantillas para la obtención de microesferas de Ag [148]. Así también se han realizado ensambles de NPs y nanobarras de Au sobre la superficie de bacterias gram positivas (*Bacillus cereus*) y se han obtenido

estructuras híbridas de orden micrométrico [30, 176]. El virus del mosaico del tabaco (TMV, por las siglas del nombre en inglés: *Tobacco Mosaic Virus*) se ha empleado para el ensamble de NPs-Au y la consiguiente obtención de nanobarras híbridas de NPs-Au/TMV, es decir, nanobarras bien definidas del TMV tabaco metalizado [29]. También se han empleado cápsides (cajas proteicas virales) de algunos virus para ensamblar NPs de óxido de Fe y cobalto [177].

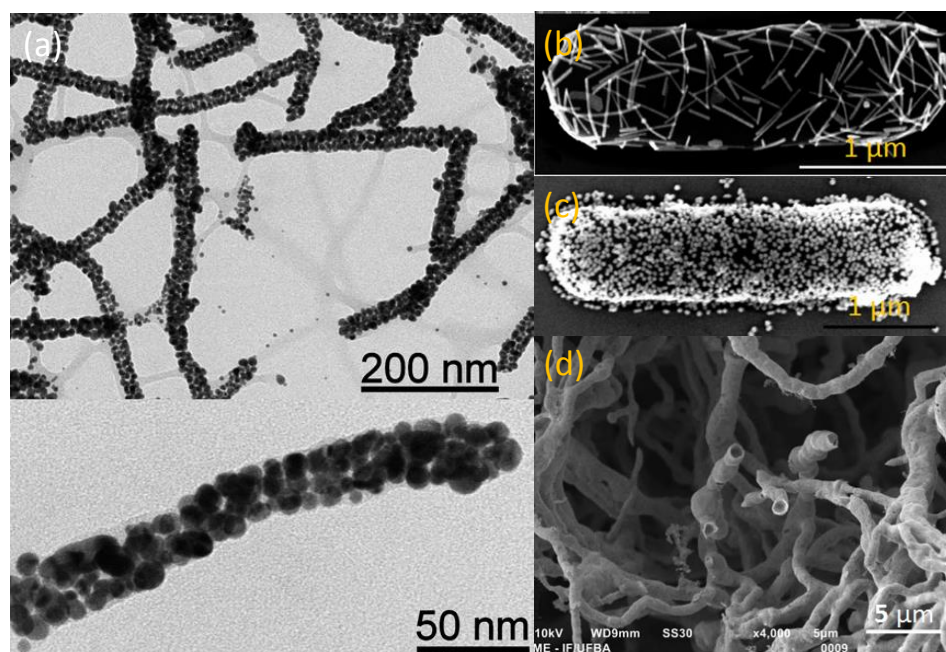


Figura 1.10. Imágenes (a) TEM de nanoalambres de TMV cubiertas con NPs-Au [29]; (b) Nanobarras (25 nm de diámetro y 400 nm de longitud) depositadas sobre la superficie de la bacteria *Bacillus cereus* [176]; (c) Nanoesferas (45 nm de diámetro) depositadas sobre la superficie de la bacteria *Bacillus cereus* [176]; (d) Microtubos de Au usando el hongo *Penicillium sp.* como bioplantilla [175].

Se ha explorado de igual forma el empleo de la celulosa y la celulosa microbiana para el ensamble de NPs-Ag y NPs-Au, respectivamente. En el caso de la celulosa se han obtenido arreglos en 2D de NPs-Ag y con la celulosa microbiana se obtuvieron nanoarreglos lineales de NPs de Au [147, 178]. La seda de araña fue utilizada para ensamblar NPs de Au y obtener estructuras lineales de Au sólidas de orden micrométrico [179].

Las bioplantillas parecen ser una buena alternativa para el ensamble de nanoestructuras que luego pueden ser aplicadas en diversos campos, no solamente debido a las propiedades del material inorgánico final sintetizado, sino como estructuras híbridas aplicables en microelectrónica [181], ingeniería de tejidos [182, 183], biosensores [184, 185], materiales para baterías [30], antibacteriales [186, 187] y mejorar las propiedades mecánicas [180]. Además de lo anterior, los procesos en los que se usan las bioplantillas son amigables con el medio ambiente. Sin embargo, la mayoría de estas bioplantillas exigen un grado apreciable de cuidado y presentan ciertas limitaciones. Por ejemplo, los hongos usados en la mayoría de los trabajos publicados son patógenos [28, 171-173] y su manipulación representa un peligro para la salud; además, su uso como bioplantillas ha estado limitado, ya que los únicos reportes de autoensamble con estas bioplantillas es con Au. Cabe señalar que en todos los trabajos publicados sobre estas bioplantillas, los resultados obtenidos son redes desordenadas y entremezcladas de microestructuras. Además, muchas de las microestructuras finales tienen muy poca densidad de nanopartículas. Estas deficiencias en la técnica de autoensamble de NPs-M por medio de bioplantillas dificultan la incorporación de las estructuras obtenidas en aplicaciones tecnológicas.

Bibliografía

- [1] G. Cao. *Nanostructures & nanomaterials, synthesis, properties & applications*. Imperial College Press, Reino Unido, 2004.
- [2] H. E. Schaefer. *Nanoscience, the science of the small in physics, engineering, chemistry, biology and medicine*. Springer-Verlag, Alemania, 2010.
- [3] J. R. Lead y E. Smith. *Environmental and human health impacts of nanotechnology*. Wiley-Blackwell, Estados Unidos, 2009.
- [4] P. J.A. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit y E. Oberdorster. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* **3**, 1-35, 2006.
- [5] M. Rieth. *Nano-engineering in science and technology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapur, 2003.
- [6] H. Gleiter. Nanocrystalline materials. *Progress in Materials Science* **33**, 223-315, 1989.
- [7] A. Hengleins. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chemical Reviews* **89**, 1861-1873, 1989.
- [8] M.C. Daniel y D. Astruc. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* **104**, 293-346, 2004.

- [9] J. N. Tiwari, Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science* **57**, 724-803, 2012.
- [10] P. Ayyub, R. Chandra, P. Taneja, A.K. Sharma y R. Pinto. Synthesis of nanocrystalline material by sputtering and laser ablation at low temperatures. *Applied Physics A* **73**, 67-73, 2001.
- [11] L. J. Guo. Nanoimprint lithography: methods and material requirements. *Advanced Materials* **19**, 495-513, 2007.
- [12] Y. Xia, J. A. Rogers, K. E. Paul, y G. M. Whitesides. Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures. *Chemical Reviews* **99**, 1823-1848, 1999.
- [13] H. Jung, S. Kim, D. Han, J. Jang, S. Oh, J. H. Choi, E. S. Lee y J. W Hahn. Plasmonic lithography for fabricating nanoimprint masters with multi-scale patterns. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **25**, 055004, 2015.
- [14] V. Resta, J. Gonzalo, C. N. Afonso, E. Piscopiello y J. García López. Coverage induced regulation of Au nanoparticles during pulsed laser deposition. *Journal of Applied Physics* **109**, 094302, 2011.
- [15] H. Zhang, W. Zhou, Y. Du, P. Yang y C. Wang. One-step electrodeposition of platinum nanoflowers and their high efficient catalytic activity for methanol electro-oxidation. *Electrochemistry Communications* **12**, 882-885, 2010.

- [16] D. V. Talapin, J. S. Lee, M. V. Kovalenko y E. V. Shevchenko. Prospects of colloidal nanocrystals for electronic and optoelectronic applications. *Chemical Reviews* **110**, 389-458, 2010.
- [17] B. S. R. Reddy. *Advances in nanocomposites synthesis, characterization and industrial applications*. Intech, Croacia, 2011.
- [18] J. Lu, D. Wang y C. Zhao. $\text{CaCu}_3\text{Ti}_4\text{O}_{12}$ ceramics from basic co-precipitation (BCP) method: fabrication and properties. *Journal of Alloys and Compounds* **509**, 3103-3107, 2011.
- [19] F. F. Tao. *Metal nanoparticles for catalysis: advances and applications*. Royal Society of Chemistry, Reino Unido, 2014.
- [20] T. K. Sau, A. L. Rogach, F. Jäckel, T. A. Klar y J. Feldmann. Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. *Advanced Materials* **22**, 1805-1825, 2010.
- [21] S. E. Lohse y C. J. Murphy. Applications of colloidal inorganic nanoparticles: From medicine to energy. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 15607-15620, 2012.
- [22] M. Rai, A. Yadav y A. Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **27**, 76-83, 2009.
- [23] F. K. Alanazi, A. A. Radwan y I. A. Alsarra. Biopharmaceutical applications of nanogol. *Saudi Pharmaceutical Journal* **18**, 179-193, 2010.

- [24] Y. Zhang, W. Chu, A. D. Foroushani, H. Wang, D. Li, J. Liu, C. J. Barrow, X. Wang y W. Yang. New gold nanostructures for sensor applications: a review. *Materials* **7**, 5169-5201, 2014.
- [25] H. Goesmann y C. Feldmann. Nanoparticulate functional materials, *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1362-1395, 2010.
- [26] K. Punjabi, P. Choudhary, L. Samant, S. Mukherjee, S. Vaidya y A. Chowdhary. Biosynthesis of nanoparticles: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **30**, 219-226, 2015.
- [27] S. A. Maier. *Plasmonics: fundamentals and applications*. Springer, Alemania, 2007.
- [28] A. Sugunan, P. Melin, J. Schnürer, J. G. Hilborn y J. Dutta. Nutrition-driven assembly of colloidal nanoparticles: growing fungi assemble gold nanoparticles as microwires. *Advanced Materials* **19**, 77-81, 2007.
- [29] K. M. Bromley, A. J. Patil, A. W. Perriman, G. Stubbs y S. Mann. Preparation of high quality nanowires by tobacco mosaic virus templating of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **18**, 4796-4801, 2008.
- [30] V. Berry, A. Gole, S. Kundu, C. J. Murphy y R. F. Saraf. Deposition of CTAB-terminated nanorods on bacteria to form highly conducting hybrid systems. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 17600-17601, 2005.
- [31] Y. Volokitin, J. Sinzig y L. J. Jongh. Quantum-size effects in the thermodynamic properties of metallic nanoparticles. *Nature* **384**, 621-626, 1996.

- [32] C. C. Koch. Structural nanocrystalline materials: an overview. *Journal of Materials Science* **42**, 1403-1414, 2007.
- [33] U. Kreibig y M. Vollmer. *Optical properties of metal clusters*. Springer Series in Material Science, Alemania, 1995.
- [34] H. Gleiter. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia* **48**, 1-29, 2000.
- [35] G. Schön y U. Simon. A fascinating new field in colloid science: small ligand-stabilized metal clusters and their possible application in microelectronics. *Colloid and Polymer Science* **273**, 202-218, 1995.
- [36] B. Y. Ahn, E. B. Duoss, M. J. Motala, X. Guo, S. I. Park, Y. Xiong, J. Yoon, R. G. Nuzzo, J. A. Rogers y J. A. Lewis. Omnidirectional printing of flexible, stretchable, and spanning silver microelectrodes. *Science* **323**, 1590-1593, 2009.
- [37] R. Narayanan y M. A. El-Sayed. Catalysis with transition metal nanoparticles in colloidal solution: nanoparticle shape dependence and stability. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 12663-12676, 2005.
- [38] T. D. Thompson. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today* **2**, 40-43, 2007.
- [39] A. Patel, P. Prajapati y R. Boghra. Overview on application of nanoparticles in cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Clinical Research* **1**, 40-55, 2011.

- [40] T. Muralisankar, P. S. Bhavan, S. Gandhimathy, S. Radhakrishnan, C. Seenivasan y P. Aarumugam. In –vitro antibacterial activity of zinc and copper nanoparticles against gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Malaya Journal of Biosciences* **1**, 196-200, 2014.
- [41] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong y M. H. Cho. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **3**, 95-101, 2007.
- [42] M. Singh, M. Kumar, R. Kalaivani, S. Manikandan y A. K. Kumaraguru. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **36**, 407-415, 2012.
- [43] S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra y M. Galdiero. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* **16**, 8894-8918, 2011.
- [44] G. Doria. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors* **12**, 1657-1687, 2012.
- [45] M. Yang, J. Wang y F. Zhou. Biomarker detections using functional noble Metal nanoparticles. *ACS Symposium Series* **1112**, 177-205, 2012.
- [46] G. C. Jensen, C. E. Krause, G. A. Sotzingab y J. F. Rusling. Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. Application to immunodetection of a cancer biomarker protein. *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**, 4888-4894, 2011.
- [47] E. C. Dreaden. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews* **41**, 2740-2779, 2012.

- [48] K.I. Bogutska, Y. P. Sklyarov y Y. I. Prylutsky. Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine. *Ukrainica Bioorganica Acta* **1**, 9-16, 2013.
- [49] S. Lahkar. A comprehensive review on metallic nanoparticles. *International Journal of Inventions in Pharmaceutical Sciences* **2**, 803-807, 2014.
- [50] D. A. Giljohann. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3280-3294, 2010.
- [51] J. Conde, G. Doria y P. Baptista. Noble metal nanoparticles applications in cancer, *Journal of Drug Delivery* **2012**, 751075, 2012.
- [52] J. Polte. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *Crystal Engineering Communications* **17**, 6809-6830, 2015.
- [53] G. Schmid. Large clusters and colloids - metals in the embryonic state. *Chemical Reviews* **92**, 1709-1727, 1992.
- [54] R. A. Sperling y W. J. Parak. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**, 1333-1383, 2010.
- [55] K. F. Aguey-Zinsou y J. R. Ares-Fernández. Hydrogen in magnesium: new perspectives toward functional stores. *Energy & Environmental Science* **3**, 526-543, 2010.
- [56] J. Turkevich, P. C. Stevenson, y J. Hillier. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **11**, 55-75, 1951.

- [57] G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science* **241**, 20-22, 1973.
- [58] M. Giersig y P. Mulvaney. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir* **9**, 3408-3413, 1993.
- [59] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin y R.J. Whyman. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **7**, 801-802, 1994.
- [60] K. Mavani y M. Shah. Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent. *International Journal of Engineering Research & Technology* **2**, 1-5, 2013.
- [61] N. V. Suramwar, S. R. Thakare y N. T. Khaty. One pot synthesis of copper nanoparticles at room temperature and its catalytic activity. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2012.04.034, 2012.
- [62] D. Deng, Y. Jin, Y. Cheng, T. Qi y F. Xiao. Copper nanoparticles: aqueous phase synthesis and conductive films fabrication at low sintering temperature. *ACS Applied Materials & Interfaces* **5**, 3839-3846, 2013.
- [63] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney y R. W. Murray. Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir* **25**, 13840-13851, 2009.
- [64] E. G. Castro, R. V. Salvatierra, W. H. Schreiner, M. M. Oliveira y A. J. G. Zarbin. Dodecanethiol-stabilized platinum nanoparticles obtained by a two-phase method:

synthesis, characterization, mechanism of formation, and electrocatalytic properties. *Chemistry of Materials* **22**, 360-370, 2010.

[65] K. S. Kim, D. Dembereinyamba y H. Lee. Size-selective synthesis of gold and platinum nanoparticles using novel thiol-functionalized ionic liquids. *Langmuir* **20**, 556-560, 2004.

[66] C. K. Yee. Novel one-phase synthesis of thiol-functionalized gold, palladium, and iridium nanoparticles using superhydride. *Langmuir* **15**, 3486-3491, 1999.

[67] N. N. Kariuki. Composition-controlled synthesis of bimetallic gold-silver nanoparticles. *Langmuir* **20**, 11240-11246, 2004.

[68] S. Chen. 4-Hydroxythiophenol-protected gold nanoclusters in aqueous media. *Langmuir* **15**, 7551-7557, 1999.

[69] R. S. Ingram, M. J. Hostetler y R. W. Murray. Poly-hetero- ω -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 9175-9178, 1997.

[70] R. P. Andres, J. D. Bielefeld, J. I. Henderson, D. B. Janes, V. R. Kolagunta, C. P. Kubiak y W. J. Mahoney. Self-assembly of a two-dimensional superlattice of molecularly linked metal clusters. *Science* **273**, 1690-1693, 1996.

[71] C. K. Yee, R. Jordan, A. Ulman, H. White, A. King, M. Rafailovich y J. Sokolov. Novel one-phase synthesis of thiol-functionalized gold, palladium, and iridium nanoparticles using superhydride. *Langmuir* **15**, 3486-3491, 1999.

- [72] P. R. Selvakannan, S. Mandal, R. Pasricha, S. D. Adyanthaya y M. Sastry. One-step synthesis of hydrophobized gold nanoparticles of controllable size by the reduction of aqueous chloroaurate ions by hexadecylaniline at the liquid-liquid interface. *Chemical Communications* **13**, 1334-1335, 2002.
- [73] S. F. Adil, M. E. Assal, M. Khan, A. Al-Warthan, M. R. H. Siddiqui y L. M. Liz-Marzan. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles and prospects toward green chemistry. *Dalton Transactions* **00**, 1-10, 2014.
- [74] J. L. Gardea-Torresdey, J. G. Parsons, E. Gomez, J. Peralta-Videa, H. E. Troiani, P. Santiago y M. J. Yacaman. Formation and growth of Au nanoparticles inside live Alfalfa plants. *Nano Letters* **2**, 397-401, 2002.
- [75] A. R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta, M. A. Camacho-López, R. M. Gómez-Espinosa, M. A. Camacho-López y J. A. Arenas-Alatorre. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters* **62**, 3103-3105, 2008.
- [76] J. Das y P. Velusamy. Catalytic reduction of methylene blue using biogenic gold nanoparticles from *Sesbania grandiflora* L. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **45**, 2280-2285, 2014.
- [77] L. E. Silva-de-Hoyos, V. Sánchez-Mendieta, A. Rico-Moctezuma y A. R. Vilchis-Nestor. Silver nanoparticles biosynthesized using *Opuntia ficus* aqueous extract. *Superficies y Vacío* **25**, 31-35, 2012.

- [78] A. Saxena, R.M. Tripathi, F. Zafar y P. Singh. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. *Materials Letters* **67**, 91-94, 2012.
- [79] B. Zheng, T. Kong, X. Jing, T. Odoom-Wubah, X. Li, D. Sun, F. Lu, Y. Zheng, J. Huang, Q. Li. Plant-mediated synthesis of platinum nanoparticles and its bioreductive mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science* **396**, 138-145, 2013.
- [80] A. Kalaiselvi, S. M. Roopan, G. Madhumitha, C. Ramalingam y G. Elango. Synthesis and characterization of palladium nanoparticles using *Catharanthus roseus* leaf extract and its application in the photo-catalytic degradation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **135**, 116-119, 2015.
- [81] U. K. Parida, B. K. Bindhani y P. Nayak. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using onion (*Allium cepa*) extract. *World Journal of Nano Science and Engineering* **1**, 93-98, 2011.
- [82] D. Jain, D. H. Kumar, S. Kachhwaha y S. L. Kothari. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **4**, 557-563, 2009.
- [83] D. N. Castillo-López y U. Pal. Green synthesis of Au nanoparticles using potato extract: stability and growth mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* **16**, 2571, 2014.
- [84] R. U. Maheswari, A. L. Prabha, V. Nandagopalan y V. Anburaja. Green synthesis of silver nanoparticles by using rhizome extract of *Dioscorea oppositifolia* L. and their anti-

microbial activity against human pathogens. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* **1**, 38-42, 2012.

[85] P. Kuppusamy, M. M. Yusoff, G. P. Maniam y N. Govindan. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - an updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.013, 2015.

[86] P. Logeswari, S. Silambarasan y J. Abraham. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica F* **20**, 1049-1054, 2013.

[87] N. I. Hulkoti y T. C. Taranath. Biosynthesis of nanoparticles using microbes - a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **121**, 474-483, 2014.

[88] X. Li, H. Xu, Z. S. Chen y G. Chen. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials* **2011**, 270974, 2011.

[89] K. B. Narayanan y N. Sakthivel. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* **156**, 1-13, 2010.

[90] K. Kalishwaralal, V. Deepak, S. R. K. Pandian, M. Kottaisamy, S. BarathManiKanth, B. Kartikeyan y S. Gurunathan. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **77**, 257-262, 2010.

[91] M. I. Husseiny, M. A. El-Aziz, Y. Badr y M. A. Mahmoud. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A* **67**, 1003-1006, 2001.

- [92] S. He, Z. Guo, Y. Zhang, S. Zhang, J. Wang y N. Gu. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Materials Letters* **61**, 3984-3987, 2007.
- [93] Y. Nangia, N. Wangoo, N. Goyal, G. Shekhawat y C. Raman Suri. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microbial Cell Factories* **8**, 39, 2009.
- [94] P. Yong, N. A. Rowsen, J. P. G. Farr, I. R. Harris y L. E. Macaskie. Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307. *Biotechnology and Bioengineering* **80**, 369-379, 2002.
- [95] A. K. Suresh, D. A. Pelletier, W. Wang, M. L. Broich, J. W. Moon, Ba. Gu, D. P. Allison, D. C. Joy, T. J. Phelps y M. J. Doktycz. Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomaterialia* **7**, 2148-2152, 2011.
- [96] K. Kathiresan, S. Manivannan, M.A. Nabeel y B. Dhivya. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **71**, 133-137, 2009.
- [97] M. Kowshik, S. Ashtaputre, S. Kharrazi, W. Vogel, J. Urban, S. K. Kulkarni y K. M. Paknikar. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology* **14**, 95-100, 2003.
- [98] A. M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P. T. Kalaichelvan y R. Venketesan. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a

study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **6**, 103-109. 2010.

[99] G. Singaravelu, J. S. Arockiamary, V. Ganesh Kumar y K. Govindaraju. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **57**, 97-101, 2007.

[100] J. Xie, J. Y. Lee, D. I. Wang y Y. P. Ting. Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions. *Small* **3**, 672-682, 2007.

[101] P. Mohanpuria, N. K. Rana y S. K. Yadav. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 507-517, 2008.

[102] A. Schröfel, G. Kratošová, I. Šafárik, M. Šafariková, I. Raška y L. M. Shor. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - a review. *Acta Biomaterialia* **10**, 4023-4042, 2014.

[103] A. Schröfel y G. Kratošová. Biosynthesis of metallic nanoparticles and their applications. *Fundamental Biomedical Technologies* **5**, 373-409. 2011.

[104] R. Gromnicova, H. A. Davies, P. Sreekanthreddy, I. A. Romero, T. Lund, I. M. Roitt, J. B. Phillips y D. K. Male. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PLOS ONE* **8**, e81043, 2013.

- [105] Q. Y. Cai, S. H. Kim, K. S. Choi, S. Y. Kim, S. J. Byun, K. W. Kim, S. H. Park, S. K. Juhng y K. H. Yonn. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for X-ray computed tomography in mice. *Investigative Radiology* **42**, 797-806, 2007.
- [106] J. Li. A novel functional CT contrast agent for molecular imaging of cancer. *Physics in Medicine and Biology* **55**, 4389-4397, 2010.
- [107] J. R. Kanwar. Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **8**, 399-414, 2012.
- [108] M. C. Moulton. Synthesis, characterization and biocompatibility of “green” synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. *Nanoscale* **2**, 763-770, 2010.
- [109] K. P. Kumar, W. Paul y C. P. Sharma. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility. *Process Biochemistry* **46**, 2007-2013, 2011.
- [110] A. Mishra, S. K. Tripathy, R. Wahab, S. H. Jeong, I. Hwang, Y. B. Yang, Y. S. Kim, H. S. Shin y S. I Yun. Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C2C12 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**, 617-630, 2011.
- [111] V. Venkatpurwar, A. Shiras y V. Pokharkar. Porphyrin capped gold nanoparticles as a novel carrier for delivery of anticancer drug: in vitro cytotoxicity study. *International Journal of Pharmaceutics* **409**, 314-320, 2011.

- [112] D. Barbaro, L. Di Bari, V. Gandin, C. Evangelisti, G. Vitulli, E. Schiavi, C. Marzano, A. M. Ferretti, P. Salvadori. Glucose-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by metal vapour synthesis are electively internalized in a pancreatic adenocarcinoma cell line expressing GLUT1 transporter. *PLOS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0123159, 2015.
- [113] J. W. Kim y C. V. Dang. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Research* **66**, 8927-8930, 2006.
- [114] B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe y R. P. Van Duyne. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today* **15**, 16-25, 2012.
- [115] S. Schlücker. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 4756-4795, 2014.
- [116] Y. S. Hub, A. J. Chung y D. Erickson. Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 285-297, 2009.
- [117] L. Guerrini y D. Graham. Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy applications. *Chemical Society Reviews* **41**, 7085-7107, 2012.
- [118] X. Chen, C. Jiang y S. Yu. Nanostructured materials for applications in surface-enhanced Raman scattering. *Crystal Engineering Communications* **16**, 9959-9973, 2014.
- [119] E. Le Ru y P. Etchegoin. *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects*. Elsevier Science, Wellington, Nueva Zelanda, 2009.

- [120] E. Blackie. *Quantification of the enhancement factor in surface-enhanced Raman scattering*. Victoria University of Wellington. The MacDiarmid Institute for Advanced Materials and Nanotechnology, Nueva Zelanda, 2010.
- [121] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer y P. G. Etchegoin. Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: a comprehensive study. *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 13794-13803, 2007.
- [122] M. Fleischmann, P. J. Hendra y A. J. McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**, 163-166, 1974.
- [123] D. L. Jeanmaire y R. P. Van Duyne. Surface Raman electrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **84**, 1-20, 1977.
- [124] M. G. Albrecht y J. A. Creighton. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society* **99**, 5215-5219, 1977.
- [125] M. Moskovits. Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Moderns Physics* **57**, 783, 1985.
- [126] S. H. A. Nicolai y J. C. Rubim. Surface-enhanced resonance Raman (SERR) spectra of methylene blue adsorbed on a silver electrode. *Langmuir* **19**, 4291-4294, 2003.
- [127] R. R. Naujok, R. V. Duevel y R. M. Corn. Fluorescence and Fourier transform surface-enhanced Raman scattering measurements of methylene blue adsorbed onto a sulfur-modified gold electrode. *Langmuir* **9**, 1771-1774, 1993.
- [128] W. Yan, L. Bao, S. M. Mahurin y S. Dai. Silver-coated zeolite crystal films as surface-enhanced Raman scattering substrates. *Applied Spectroscopy* **58**, 18-25, 2004.

- [129] H. Yamada, H. Nagata y K. Kisbibe. Surface resonance Raman spectra of dyes adsorbed on metals. *The Journal of Physical Chemistry A* **90**, 818-823, 1986.
- [130] Z. Wang y L. J. Rothberg. Silver nanoparticle coverage dependence of surface-enhanced Raman scattering. *Applied Physics B* **84**, 289-293, 2006.
- [131] M. Baia, F. Toderas, L. Baia, J. Popp y S. Astilean. Probing the enhancement mechanisms of SERS with p-aminothiophenol molecules adsorbed on self-assembled gold colloidal nanoparticles. *Chemical Physics Letters* **422**, 127-132, 2006.
- [132] N. Nuntawong, M. Horprathum, P. Eiamchai, K. Wong-ek, V. Patthanasettakul y P. Chindaudom. Surface-enhanced Raman scattering substrate of silver nanoparticles depositing on AAO template fabricated by magnetron sputtering. *Vacuum* **84**, 1415-1418, 2010.
- [133] C. Ruan, W. Wang y B. Gu. Single-molecule detection of thionine on aggregated gold nanoparticles by surface enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 568-573, 2007.
- [134] S. Hong y X. Li. Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. *Journal of Nanomaterials* **2013**, 790323, 2013.
- [135] G. N. Xiao y S. Q. Man. Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters* **447**, 305-309, 2007.
- [136] G. Lu, H. Li, S. Wu, P. Chen y H. Zhang. High-density metallic nanogaps fabricated on solid substrates used for surface enhanced Raman scattering. *Nanoscale* **4**, 860-863, 2010.

- [137] F. Zhang, P. Chen, L. Zhang, S. C. Mao, L. Lin, Y. G. Tang, J. C. Cui, X. D. Qi, J. H. Yang y Y. F. Ma. Enhancement of Raman scattering by field superposition of rough submicrometer silver particles. *Applied Physics Letters* **100**, 173103, 2012.
- [138] Y. Lu, G. L. Liu, J. Kim, Y. X. Mejia y L. P. Lee. Nanophotonic crescent moon structures with sharp edge for ultrasensitive biomolecular detection by local electromagnetic field enhancement effect. *Nano Letters* **5**, 119-124, 2005.
- [139] J. Qi, Y. Li, M. Yang, Q. Wu, Z. Chen, J. Peng, Y. Liu, W. Wang, X. Yu, Q. Sun y J. Xu. Fabrication of nanowire network AAO and its application in SERS. *Nanoscale Research Letters* **8**, 495, 2013.
- [140] Y. J. Liu, H. Y. Chu y Y. P. Zhao. Silver nanorod array substrates fabricated by oblique angle deposition: morphological, optical, and SERS characterizations. *The Journal of Physical Chemistry C* **114**, 8176-8183, 2010.
- [141] I. Chakraborty, S. Bag, U. Landman y T. Pradeep. Atomically precise silver clusters as new SERS substrates. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **4**, 2769-2773, 2013.
- [142] J. B. Jackson y N. J. Halas. Surface-enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates. *Proceedings of National Academy of Science* **101**, 17930-17935, 2004.
- [143] S. Nie y S. R. Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* **275**, 1103-1105, 1997.

- [144] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari y M. S. Feld. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical Reviews Letters* **78**, 1667, 1997.
- [145] P. N. Sisco y C. J. Murphy. Surface-coverage dependence of surface-enhanced Raman scattering from gold, nanocubes on self-assembled monolayers of analyte. *The Journal of Physical Chemistry A* **113**, 3973-3978, 2009.
- [146] K. Quester, M. Avalos-Borja, A. R. Vilchis-Nestor, M. A. Camacho-López y E. Castro-Longoria. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* Extract. *PLOS ONE* **8**, e77486, 2013.
- [147] W. W. Yu y I. M. White. Inkjet printed surface enhanced Raman spectroscopy array on cellulose paper. *Analytical Chemistry* **82**, 9626-9630, 2010.
- [148] D. P. Yang, S. Chen, P. Huang, X. Wang, W. Jiang, O. Pandolia y D. Cui. Bacteria-template synthesized silver microspheres with hollow and porous structures as excellent SERS substrate. *Green Chemistry* **12**, 2038-2042, 2010.
- [149] N. L. Garrett, P. Vukusic, F. Ogrin, E. Sirotkin, C. P. Winlove y J. Moger. Spectroscopy on the wing: naturally inspired SERS substrates for biochemical analysis. *Journal of Biophotonics* **2**, 157-166, 2009.
- [150] N. Félidj, J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, M. Salerno, G. Schider, B. Lamprecht, A. Leitner y F. R. Aussenegg. Controlling the optical response of regular arrays of gold particles for surface-enhanced Raman scattering. *Physical Review B* **65**, 075419, 2002.

- [151] D. A. Stuart, J. M. Yuen, N. Shah, O. Lyandres, C. R. Yonzon, M. R. Glucksberg, J. T. Walsh y R. P. Van Duyne. In vivo glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **78**, 7211-7215, 2006.
- [152] N. Félidj, J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner y F. R. Aussenegg. Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays. *Applied Physics Letters* **82**, 3095, 2003.
- [153] M. Grzelczak, J. Vermant, E. M. Furst y L. M. Liz-Marzán. Directed self-assembly of nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 3591-3605, 2010.
- [154] M. Quinten, A. Leitner, J. R. Krenn y F. R. Aussenegg. Electromagnetic energy transport via linear chains of silver nanoparticles. *Optics Letters* **23**, 1331-1333, 1998.
- [155] J. R. Krenn. Nanoparticle waveguides: watching energy transfer. *Nature Materials* **2**, 210-211, 2003.
- [156] M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C. H. Moran, Q. Zhang, D. Qin y Y. Xia. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical Reviews* **111**, 3669-3712, 2011.
- [157] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic y J. J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, 607-609, 1996.
- [158] S. Si, M. Raula, T. K. Paira y T. K. Mandal. Reversible self-assembly of carboxylated peptide-functionalized gold nanoparticles driven by metal-ion coordination. *Chemical Physics and Physical Chemistry* **9**, 1578-1584, 2008.

- [159] A. Kumar, A. B. Mandale y M. Sastry. Sequential electrostatic assembly of amine-derivatized gold y carboxylic acid-derivatized silver colloidal particles on glass substrates. *Langmuir* **16**, 6921-6926, 2000.
- [160] S. Huang, G. Tsutsui, H. Sakaue, S. Shingubara y T. Takahagi. Experimental conditions for a highly ordered monolayer of gold nanoparticles fabricated by the Langmuir–Blodgett method. *Journal of Vacuum Science & Technology B* **19**, 2045, 2001.
- [161] Z. Deng, Y. Tian, S. H. Lee, A. E. Ribbe y C. Mao. DNA-encoded self-assembly of gold nanoparticles into one-dimensional arrays. *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 3582-3585, 2005.
- [162] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan y G. Ben-Yoseph. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature* **391**, 775-778, 1998.
- [163] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan y E. Braun. Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. *Science* **297**, 72-75, 2002.
- [164] D. Coomber, D. Bartczak, S. R. Gerrard, S. Tyas, A. G. Kanaras y E. Stulz. Programmed assembly of peptide-functionalized gold nanoparticles on DNA templates. *Langmuir* **26**, 13760-13762, 2010.
- [165] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel y W. Pompe. DNA as a selective metallization template. *Nano Letters* **2**, 841-844, 2002.
- [166] J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plaschke y H. K. Schackert. Nanoscale palladium metallization of DNA. *Advanced Materials* **12**, 507-510, 2000.

- [167] T. S. D. Ugarte, J. M. Bonard, A. Chatelein y W. A. Heer. Filling carbon nanotubes. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **67**, 101-105, 1998.
- [168] S. Fullam, D. Cottell, H. Rensmo y D. Fitzmaurice. Carbon nanotube templated self-assembly and thermal processing of gold nanowires. *Advanced Materials* **12**, 1430-1432, 2000.
- [169] N. Pazos-Pérez, W. Ni, A. Schweikart, R. A. Alvarez-Puebla, A. Fery y L. M. Liz-Márzan. Highly uniform SERS substrates formed by wrinkle-confined drying of gold colloids. *Chemical Science* **1**, 174-178, 2010.
- [170] J. B. Park, Y. Kim, S. K. Kim y H. Lee. Formation of self-assembled nanostructure on noble metal islands based on anodized aluminum oxide. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **25**, 563-565, 2004.
- [171] A. Rehman, M. I. Majeed, A. Ihsan, S. Z. Hussain, S. Rehman, M. A. Ghauri, Z. M. Khalid y I. Hussain. Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 6747-6754, 2011.
- [172] Z. Li, S. W. Chung, J. M. Nam, D. S. Ginger y C. A. Mirkin. Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 2306-2309, 2003.
- [173] A. Sabah, I. Dakua, P. Kumar, W. S. Mohammed, J. Dutta. Growth of templated gold microwires by self-organization of colloids on *Aspergillus Niger*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **7**, 583-591, 2012.

- [174] A. M. Fontes, R. Geris, A. V. dos Santos, M. G. Pereira, J. G. S. Ramalho, A. F. da Silva y M. Malta. Bio-inspired gold microtubes based on the morphology of filamentous fungi. *Biomaterials Science* **2**, 956-960, 2014.
- [175] N. C. Bigall, M. Reitzig, W. Naumann, P. Simon, K. H. Van Pée y A. Eychmüller. Fungal Templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 7876-7879, 2008.
- [176] V. Berry, S. Rangaswamy y R. F. Saraf. Highly selective, electrically conductive monolayer of nanoparticles on live bacteria. *Nano Letters* **4**, 939-942, 2004.
- [177] K. T. Nam, D. W. Kim, P. J. Yoo, C. Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y. M. Chiang y A. M. Belcher. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* **312**, 885-888, 2006.
- [178] T. Zhang, W. Wang, D. Zhang, X. Zhang, Y. Ma, Y. Zhou y L. Qi. Biotemplated synthesis of gold nanoparticle–bacteria cellulose nanofiber nanocomposites and their application in biosensing. *Advanced Functional Materials* **20**, 1152-1160, 2010.
- [179] A. Singh, S. Hede y M. Sastry. Spider silk as an active scaffold in the assembly of gold nanoparticles and application of the gold–silk bioconjugate in vapor sensing. *Small* **3**, 466-473, 2007.
- [180] S. M Lee, E. Pippel, U. Gösele, C. Dresbach, Y. Qin, C. V. Chandran, T. Bräuniger, G. Hause y M. Knez. Greatly increased toughness of infiltrated spider silk. *Science* **324**, 488-492, 2009.

- [181] V. Berry y R. Saraf. Self-assembly of nanoparticles on live bacterium: an avenue to fabricate electronic devices, *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 6668, 2005.
- [182] R. T. Minullina, S. A. Konnova, M. R. Dzamukova, I. R. Sharipova, A. I. Zamaleeva, D. G. Ishmuchametova, O. N. Ilinskaya y R. F. Fakhrullin. Hybrid systems based on living organisms, polymers, and nanoparticles. *Review Journal of Chemistry* **2**, 315-328, 2012.
- [183] M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara y M. Akashi. Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 4689-4692, 2007.
- [184] D. Zhang, R. F. Fakhrullin, M. Ozmen, H. Wang, J. Wang, V. N. Paunov, G. Li, y W. E. Huang. Functionalization of whole-cell bacterial reporters with magnetic nanoparticles. *Microbial Biotechnology* **4**, 89-97, 2011.
- [185] J. García-Alonso, R. F. Fakhrullin y V. N. Paunov. Rapid and direct magnetization of GFP-reporter yeast for micro-screening systems. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 1816-1819, 2010.
- [186] S. Y. Park, S. Y. Ryu y S. Y. Kwak. Antibacterial metal-fiber hybrid with covalent assembly of silver and palladium nanoparticles on cellulose fibers. *International Conference on Biology, Environment and Chemistry, IPCBEE*. **1**, 183-186, Singapore, 2011.
- [187] G. B. Hwanga, K. M. Sima, G. N. Bae y J. H. Jung. Synthesis of hybrid carbon nanotube structures coated with *Sophora flavescens* nanoparticles and their application to antimicrobial air filtration. *Journal of Aerosol Science* **86**, 44-54, 2015.

Capítulo 2

Bioplantillas (hongos)

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos e inmóviles que se alimentan por la absorción de nutrientes, se reproducen sexual y asexualmente, y cuentan con una pared celular que está en contacto con su entorno y que está compuesta principalmente de quitina y glucanos [1,2]. Los hongos se presentan bajo dos formas principales: hongos filamentosos (comúnmente conocidos como "mohos") y hongos levaduriformes (Fig. 2.1) [1,2]. Los hongos levaduriformes o simplemente levaduras son unicelulares, tienen forma casi esférica y no existe en ellos una distinción entre cuerpo vegetativo y reproductivo (Fig. 2.1a); su diámetro depende de la especie de levadura y va, típicamente, de 2 a 5 μm , aunque algunas llegan a medir hasta 40 μm [1-3]. Por otra parte, los hongos filamentosos están formados por filamentos cilíndricos o tubulares, llamados hifas (Fig. 2.1b), que van creciendo por la punta (crecimiento por el ápice) y llegan a formar una gran red de hifas denominada micelio (Fig. 2.1c) [1,2].

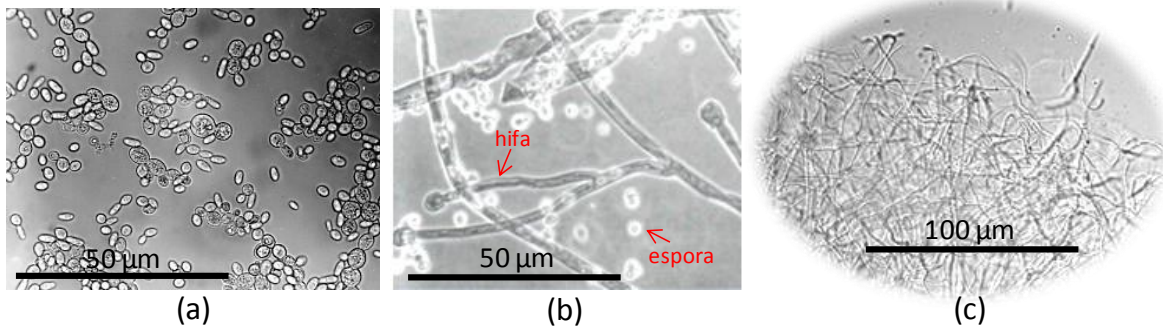


Figura 2.1. Imágenes de microscopía óptica de (a) levaduras, (b) hifas de hongos filamentosos, y (c) una red de hifas (micelio), a menor amplificación.

El cuerpo del hongo filamentosos consta de dos partes: la parte aérea o reproductiva, conformada por las esporas (comúnmente son de forma casi esférica, Fig. 2.1b), que se encuentran siempre en la superficie y son las que le dan el color que observamos macroscópicamente (Fig. 2.2a); y la parte vegetativa, formada por el micelio (Figs. 2.1c y 2.2b), que se entierra en los sustratos y absorbe los nutrientes requeridos. Las dimensiones de las hifas dependen de la especie y de las condiciones de crecimiento. Pueden llegar a medir hasta varios centímetros de longitud, pero, a menudo, tienen un diámetro constante que va de 2 a 30 μm [1,2]. Las hifas germinan de una espora y, como mencionamos antes, van creciendo por sus ápices, pero también se forman nuevas hifas por un proceso llamado “ramificación” (Fig. 2.2b), que consiste, típicamente, en la aparición de nuevos ápices a lo largo de las hifas preexistentes. Así aparecen cada vez más y más hifas y se forma una colonia de contorno circular (Fig. 2.2a). A menudo las hifas están divididas internamente por paredes transversales, llamadas “septos” (Fig. 2.2c), en compartimientos interconectados por medio de poros (de diámetros de alrededor de 0.05 a 0.5 μm) por donde el material citoplasmático y los núcleos pueden transitar (Fig. 2.2c) [1,2].

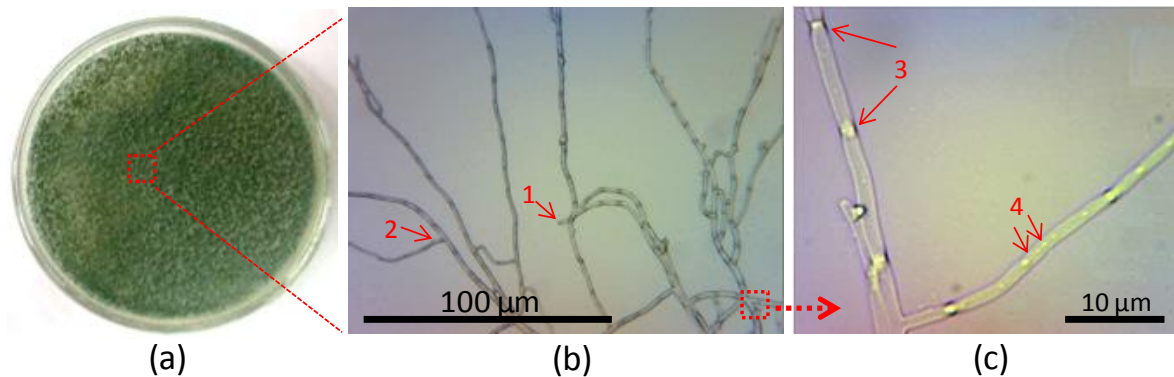


Figura 2.2. Imágenes de microscopía óptica de hongos filamentosos: (a) imagen macroscópica de una colonia de hongo filamentosos; el color verde que se observa es debido a las esporas que se encuentran en la superficie; (b) hifas del hongo donde se aprecia un ápice (1) y algunas ramificaciones (2); y (c) ampliificación de una zona de la imagen 2.2b donde se observan septos (3) y núcleos (4) de la hifa.

En el presente trabajo se utilizaron hongos filamentosos como bioplantillas. Esto significa que hemos aprovechado la forma tubular y alargada de las hifas para la fabricación de estructuras metálicas 1D. Los hongos utilizados como bioplantillas fueron el *Tricoderma asperellum* (Tas) y el *Aspegillus sydowii* (Asy), y fueron elegidos para este trabajo debido a que pudimos obtenerlos fácilmente por medio del departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias de la BUAP y a que no son patógenos.

2.1. Características de la estructura fúngica

Todas las hifas fúngicas están rodeadas por una pared de composición compleja. Esta pared es delgada en el ápice (alrededor de 50 nm), pero se va engrosando conforme aumenta la distancia a este, hasta que alcanza un grosor comprendido entre 125 nm y 250 nm, aproximadamente (Fig. 2.3) [1], que luego se mantiene constante a lo largo de la hifa. La membrana plasmática se encuentra cerca de la pared celular y parece estar firmemente unida a ella (Fig. 2.3). La pared fúngica desempeña muchas funciones fisiológicas importantes (aparte de la función obvia de proveer una barrera estructural): protege al hongo contra de la lisis osmótica; actúa como un tamiz molecular, regulando el paso de

moléculas grandes a través de sus poros; protege a la célula de la radiación ultravioleta (cuando la pared contiene pigmentos como la melanina); y también protege al hongo de las enzimas líticas de otros organismos, debido a que la pared tiene sitios enlazantes para las enzimas. Las enzimas que secreta el hongo, para degradar a monómeros los polisacáridos y los pequeños péptidos, también se enlazan a la pared celular gracias a estos sitios enlazantes y, así, los monómeros pueden difundirse a través de la membrana plasmática para su digestión.

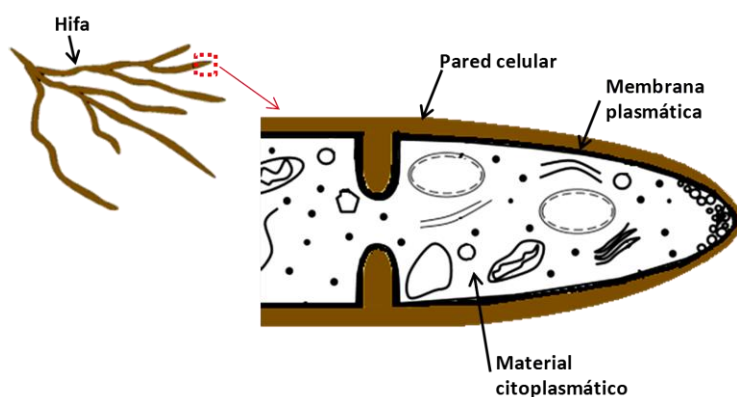


Fig. 2.3. Esquema de la punta de una hifa que muestra la pared celular (color café), la cual es delgada en el ápice, pero se va engrosando a medida que aumenta la distancia a él y, luego, mantiene un espesor constante a lo largo de la hifa. El grosor de la pared celular está comprendido entre 125 nm y 250 μ m. La línea de color negro representa la membrana plasmática.

Para nosotros es muy importante conocer la estructura y composición de la pared celular, ya que esta es la interfaz entre el hongo y el medio que lo rodea y es en ella donde tenemos la intención de acomodar o ensamblar las NPs metálicas.

Aunque relativamente muy pocos hongos han sido analizados detalladamente, todas las publicaciones indican que la pared celular está compuesta predominantemente (en un 80 a 90 %) de polisacáridos y, en muy pocas cantidades, de proteínas y otros componentes. Los principales polisacáridos de la pared son diferentes para diferentes grupos taxonómicos de hongos [1-3]. Por ello nos centraremos en la estructura de la pared del grupo Ascomycota

(tabla 2.1), ya que tanto *Tas* como *Asy* pertenecen a este grupo. En una hifa madura, la pared celular tiene una arquitectura como la que se muestra en la figura 2.4. Muchos reportes señalan que la pared celular está compuesta de dos capas: la capa más externa (amorfa) está constituida predominantemente por (1,3) glucanos, así como por algunas proteínas enlazadas a la pared; en la capa más interna (fibrilar y rígida) se encuentran arreglos casi ordenados de cadenas de quitina y algunos (1,3), (1,6) glucanos entrelazados a esta [1-3]. Sin embargo, aunque la arquitectura de la pared celular con frecuencia se presenta como constituida por capas, para su fácil visualización, en realidad todas estas capas no presentan fronteras bien definidas (Fig. 2.4). Existen substanciales uniones entre varios componentes de la pared que sirven para fortalecer la pared celular. Algunos glucanos están enlazados covalentemente a la quitina y a otros glucanos. La estructura microfibrilar formada por la quitina (las moléculas amarillas de la Fig. 2.4c) es posible debido a enlaces de puentes de hidrógeno entre estas moléculas.

Tabla 2.1. Componentes de la pared celular de mayor presencia del grupo de los Ascomicota.

Grupo taxonómico	Componentes estructurales (fibrilar)	Componentes de la matriz
Ascomicota	Quitina (Largas cadenas lineales de monómeros de N-acetilglucosamina). $\beta(1,3)$, (1,6)-glucanos (Cadenas lineales ramificadas de monómeros de D-glucosa), incrustados en la matriz fibrilar.	Manoproteínas(Son proteínas glicosiladas con restos de manosa), $\alpha(1,3)$glucanos y glicoproteínas (son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos).

En cuanto a los hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspegillus* utilizados en este trabajo como bioplantillas, los diámetros de sus hifas van de 4 a 8 μm y de 2 a 5 μm [5], respectivamente. La estructura de la pared celular de ambos géneros es, en general, como se

presenta en esta sección, ya que ambos pertenecen al grupo taxonómico de los Ascomycotas.

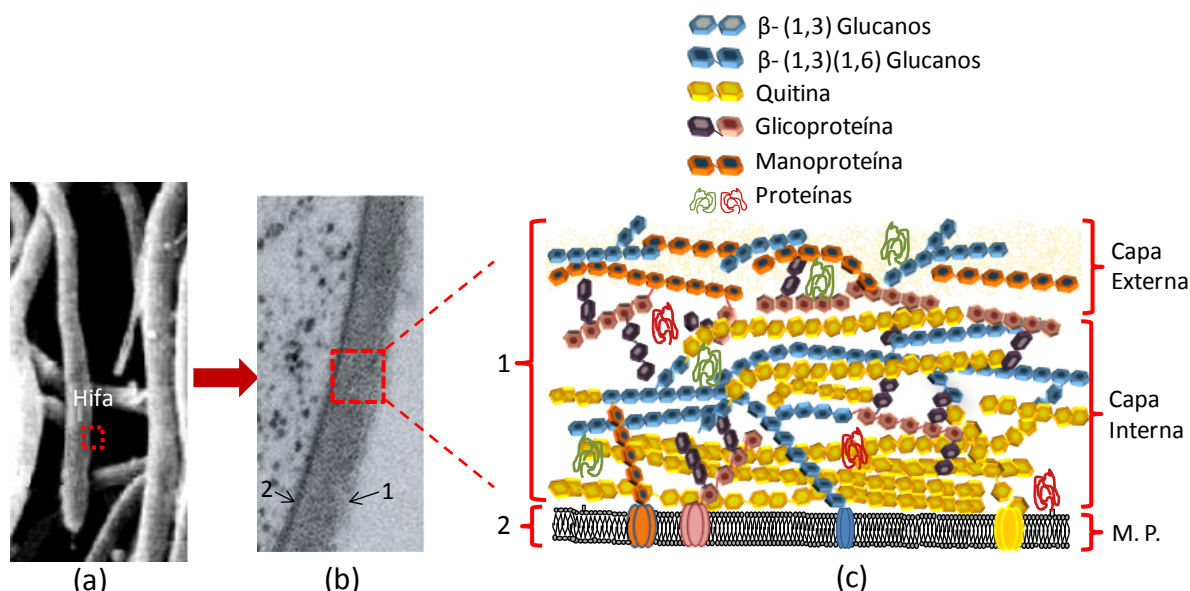


Figura 2.4. (a) Imagen de SEM de hifas de *Aspergillus fumigatus* [6]; (b) imagen de SEM de la sección transversal de una hifa en la que se visualiza la pared celular (1) y la membrana plasmática (2); (c) esquema de la arquitectura de la pared celular del hongo (en general, para los hongos del grupo *Ascomycota*) constituida mayormente por (1,3) glucanos, manoproteínas, glicoproteínas y proteínas (la capa más externa), y quitina y (1,3), (1,6) glucanos (la capa más interna). La quitina se encuentra muy cerca de la membrana plasmática (M.P.).

2.2. Parámetros y requisitos para el crecimiento de las bioplantillas: nutrientes, temperatura y pH

Los hongos tienen necesidades nutricionales muy simples. Su principal nutriente es el *carbono*, seguido por el *nitrógeno*, *hidrógeno*, *oxígeno* y el *azufre* [1,5]. Por eso, compuestos orgánicos de una amplia gama pueden ser utilizados como sustratos nutritivos para los hongos. La figura 2.5 muestra una gráfica en la que tales compuestos orgánicos están ordenados según su grado de complejidad estructural y el grado de su utilización como nutriente [1]. En esta gráfica se observa (tal como se ha reportado en la literatura) que la mayoría de los hongos utilizan, principalmente, la glucosa y otros monosacáridos como

nutrientes, debido a que un gran número de hongos tienen proteínas de transporte y sistemas de enzimas para la glucosa [1].

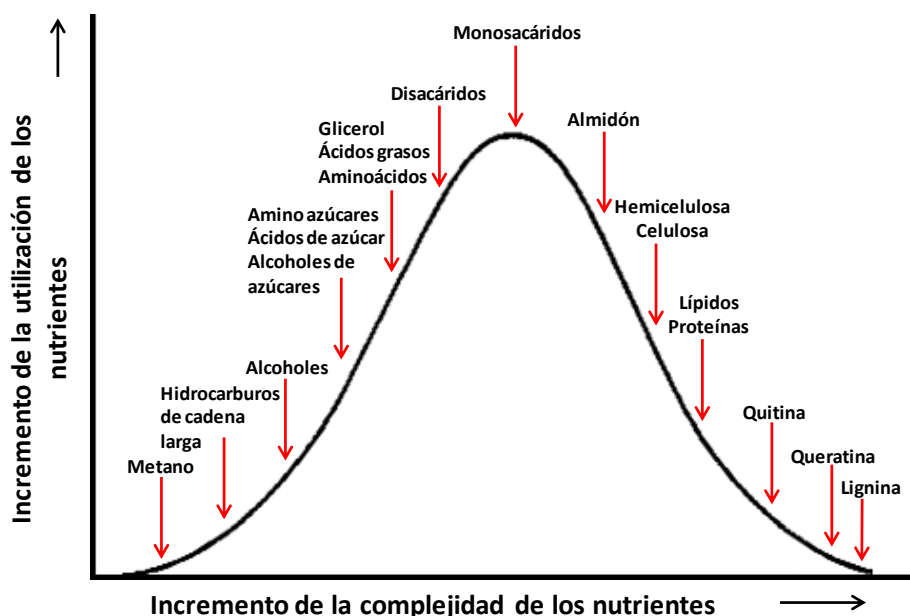


Figura 2.5. Gráfica que muestra los diferentes compuestos orgánicos que un hongo puede utilizar como nutrientes, ordenados según su grado de complejidad estructural y el grado de su utilización como nutriente [1].

Entre las necesidades nutricionales esenciales de los hongos también se encuentran los minerales, algunos en pequeñas cantidades (macronutrientes) y otros como nutrientes trazas (micronutrientes). La tabla 2.2 [5] presenta una lista de los minerales esenciales para la nutrición de los hongos.

Tabla 2.2. Tabla de los macro y micronutrientes minerales esenciales para los hongos [5].

Nutrientes	Elementos
Macronutrientes	Potasio (K^{1+})
	Fosforo (P^+)
	Magnesio (Mg^{2+})
	Nitrógeno (N)
	Azufre (S)
Micronutrientes	Calcio (Ca^{2+})
	Fierro (Fe^{3+})
	Cobre (Cu^{2+})
	Manganeso (Mn^{2+})
	Zinc (Zn^{2+})
	Molibdeno (Mo^{3+})

Para que los compuestos orgánicos nutrientes (Fig. 2.5) puedan ser absorbidos, tienen que ser, en la mayoría de los casos, degradados o descompuestos a monómeros por una gran variedad de enzimas que el mismo hongo produce y secreta. Este conjunto de enzimas varía dependiendo de la especie de hongo y del entorno en el que se encuentra; esta característica es muy valiosa, ya que está directamente relacionada con el crecimiento y supervivencia del hongo. Por ejemplo, en la gráfica de la Fig. 2.5, el metano es el elemento más simple y el menos utilizado, debido a que tiene que pasar por diferentes pasos de transformación química antes de que el hongo pueda absorber la sustancia resultante de su transformación. Se requieren tres tipos de enzimas para convertir el metano en fructuosa, la cual podrá ser absorbida (Fig. 2.6); así que, si el hongo no cuenta con tal artillería enzimática, simplemente no aprovechará el metano [1]. En otros casos, el hongo puede producir enzimas específicas que pueden degradar la fuente de carbono que haya a su alrededor. Por ejemplo, si el hongo se encuentra en un medio rico en lactosa, este la descompondrá en glucosa y galactosa, y absorberá solamente la glucosa. Pero, al agotarse la glucosa, pasará un cierto tiempo en el que se detendrá el crecimiento del hongo, mientras este sintetiza nuevas proteínas que le ayudarán a absorber la galactosa y a continuar su crecimiento [1].

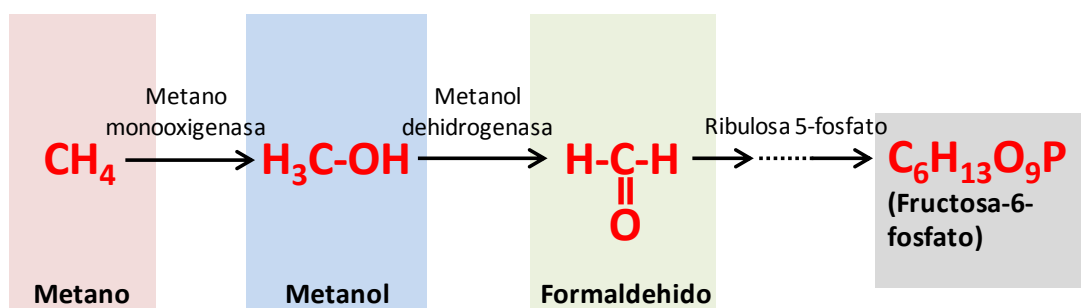


Figura 2.6. Esquema de la transformación química del metano en fructosa, la cual, a diferencia del primero, puede ser absorbida por el hongo. La obtención de fructosa a partir del metano es propiciada por diferentes enzimas que el mismo hongo secreta [1].

Hay que señalar que una concentración adecuada de nutrientes en el medio es muy importante, ya que se podría pensar que un medio rico en nutrientes sería ideal para el crecimiento óptimo del hongo y, sin embargo, en muchas ocasiones no es así. Se ha reportado que un medio con altas concentraciones de glucosa, por ejemplo, puede reprimir la formación o el transporte de ciertas enzimas, afectando el metabolismo del hongo y, por lo tanto, evitando su desarrollo y crecimiento [1,5]. De igual forma, cuando la concentración de nutrientes trazas en un medio es alta, en vez de procurar el crecimiento del hongo, esto se vuelve dañino e inhibe el crecimiento [1,7]. También es de esperarse que, cuando se tiene un medio con escaso nutriente, el crecimiento del hongo será muy lento comparado con el que ocurriría en un medio rico en nutrientes. La naturaleza y la concentración de los nutrientes son algunos de los parámetros claves para el crecimiento y desarrollo del hongo y pueden variar dependiendo de la especie. Por lo tanto, es necesario considerar estos parámetros al momento de hacer crecer, analizar y trabajar con estos microorganismos en medios de cultivo artificiales en el laboratorio.

Otros parámetros que influyen al crecimiento de las bioplantillas son el *pH* y la *temperatura del medio*. La temperatura es el aspecto físico más importante que afecta el crecimiento de los hongos. Otros aspectos físicos, como la luz, la presión hidrostática y la viscosidad, están más relacionados con la esporulación del hongo [1]. En la figura 2.7 se muestran los rangos de temperatura adecuados para el crecimiento de algunos hongos. Se puede observar que la mayoría de estos hongos son **mesófilos** (como la mayor parte de los hongos), pues crecen en rangos de temperatura de 10 a 37 °C. Para propósitos de rutina en los laboratorios, estos hongos se hacen crecer a temperatura ambiente (22-25 °C).

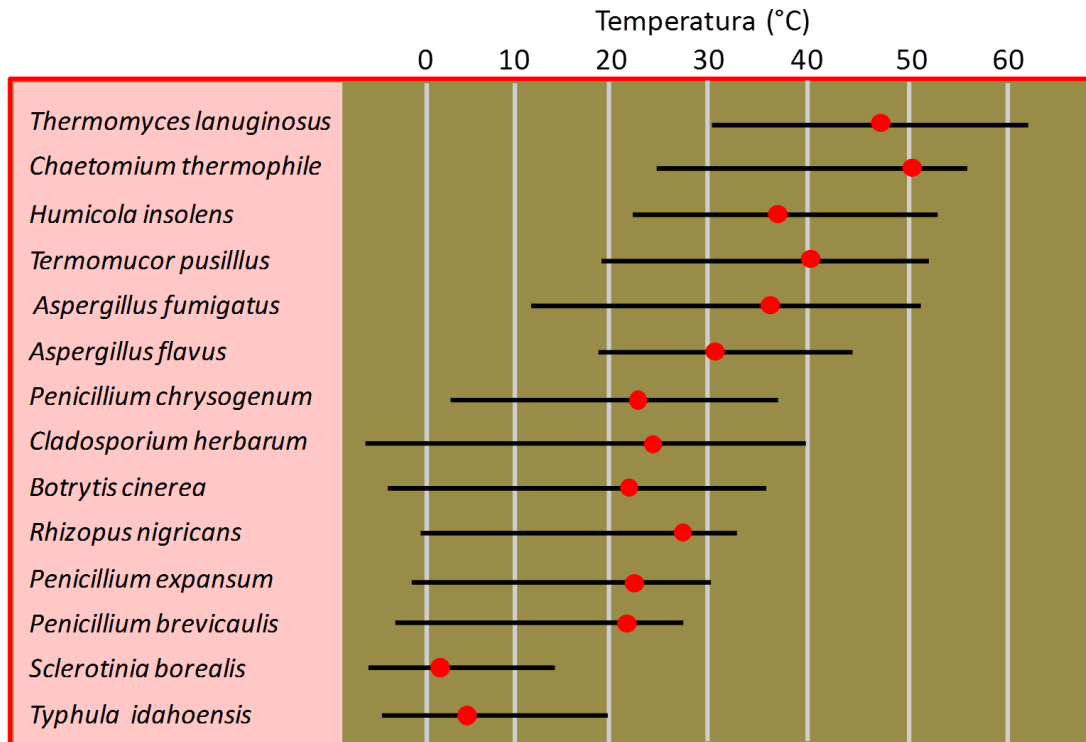


Figura 2.7. Rangos de temperatura aproximados (líneas negras) y temperaturas óptimas (puntos rojos) para el crecimiento de algunos hongos [1,5].

No hay una sola característica que determine los diferentes rangos de temperaturas propicios para el crecimiento de los hongos, ya que hay diferentes factores que contribuyen a que un hongo crezca a ciertas temperaturas, o resista o tolere temperaturas extremas que no sean las óptimas para su crecimiento. Las desviaciones de la temperatura con respecto a la temperatura óptima de crecimiento de un hongo afectan diferentes aspectos relacionados con el proceso de crecimiento. Disminuyen, por ejemplo, las reacciones químicas; se inactivan proteínas; cambia la composición de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana, afectando así su fluidez y, por lo tanto, el transporte de enzimas y nutrientes. También, tienden acumularse ciertos compuestos como los disacáridos y el glicerol como respuesta al estrés provocado por las variaciones de temperatura [1,5].

El *pH* del medio es otro parámetro importante que afecta el crecimiento de los hongos. En general, un medio ligeramente ácido, de pH entre 5 y 6, es el medio óptimo para el crecimiento de los hongos [1,5], aunque se ha reportado que existen hongos cuyo pH de crecimiento óptimo va de 4 a 8.5, de 5 a 7 o de 3 a 9 [1]. Los valores del pH utilizados en medios de cultivo artificiales van de 2 a 11. El valor exacto del pH dependerá del tipo de hongo y de la naturaleza de los nutrientes del medio [1,5].

El valor del pH afecta principalmente a los nutrientes del medio que rodea al hongo, ya que para ciertos pH estos podrían ser modificados y dejar de ser nutrientes. Por ejemplo, el pH afecta el grado de disociación de las sales minerales; un medio de pH bajo puede contener niveles potencialmente tóxicos de elementos trazas, pero, si el pH es alto, estos elementos son insuficientes. También, el pH puede hacer cambiar la carga neta de las proteínas de las membranas, afectando así la absorción de nutrientes. Cabe señalar que los hongos pueden alterar el pH del medio que los rodea, pues liberan ácidos orgánicos e iones H^+ , que propician un aumento en la acidez del medio [1,5].

Son, entonces, la naturaleza y concentración de nutrientes, la temperatura y el pH los parámetros principales que pueden afectar o facilitar la razón de crecimiento y el desarrollo de los hongos.

2.3. Medio de cultivo artificial o sintético para el crecimiento de las bioplantillas

Como se mencionó anteriormente, los hongos pueden crecer en cualquier medio que les ofrezca los nutrientes y condiciones necesarias; es por eso que los vemos crecer en plantas, suelos, frutas, alimentos, etc., es decir, en casi cualquier lugar. Pero si se quiere trabajar directamente con algunos hongos o ser sujeto de investigación, como, por ejemplo, en diagnósticos clínicos, es necesario contar en los laboratorios con medios de cultivo

artificiales que faciliten el crecimiento de tales microorganismos y ayuden a lograr su desarrollo, identificación, análisis y manipulación [1-3,5].

Los medios de cultivo artificiales que reúnen las condiciones necesarias para el crecimiento de los hongos en el laboratorio se dividen, típicamente, en *sólidos y líquidos*; los primeros son los que más se utilizan, debido a que con ellos se obtiene una mejor distribución de la colonia (micelio), un mayor crecimiento del hongo y más rápido que queda limitado a 2D. Esto permitirá su fácil identificación y manipulación (Fig. 2.8a). Los medios sólidos utilizados ordinariamente en los laboratorios son: el PDA (por la siglas de nombre en inglés: *Potato Dextrose Agar*), el SDA (por las siglas de *Sabouraud Dextrose Agar*) y el agar de harina de maíz o harina de avena. Existen otros medios sólidos más específicos utilizados en análisis clínicos o diferenciales [1,3].

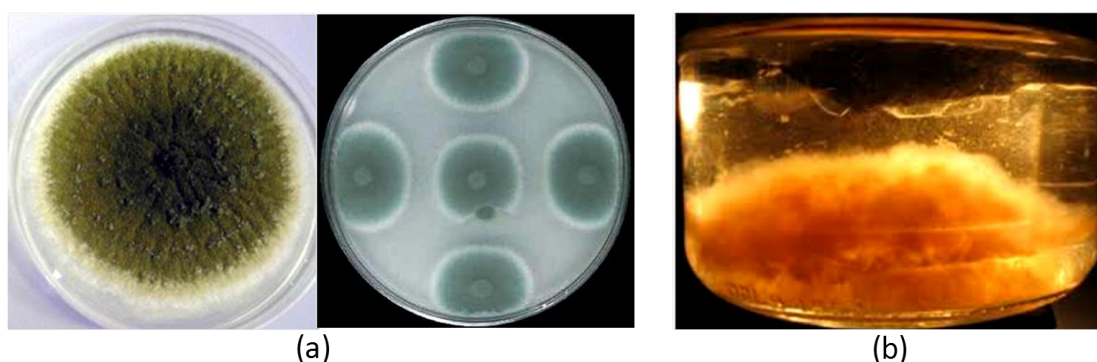


Figura 2.8. Medios de cultivo artificiales utilizados en los laboratorios para el crecimiento de los hongos: (a) sólidos y (b) líquido.

Los medios de cultivo líquidos pueden ser los mismos que los sólidos pero sin el agar, ya que éste solidifica el medio. Se utilizan caldos de papa-dextrosa, de aserrín-sucrosa, de soya-dextrosa, etc. [3,7]. Los medios de cultivos líquidos son menos utilizados, pues es más difícil identificar y manipular los hongos obtenidos; el crecimiento es en 3D, por lo que se obtiene una bola micelar (Fig. 2.8b), debido a la agregación de las esporas antes de la

germinación; el hongo puede crecer en las paredes de los recipientes lo que hace aún más difícil su manipulación [1,3].

Ambos medios, sólidos y líquidos, son comúnmente usados para promover el crecimiento favorable de la mayoría de los hongos, son simples y baratos y son ricos en nutrientes, pues contienen azúcares, proteínas, minerales y vitaminas. Por ejemplo, el PDA contiene dextrosa, papa (que es rica en almidón) y agar; el Sabouraud contiene lo mismo, pero en vez de papa tiene peptonas [1,3].

Los medios de cultivos artificiales pueden ser preparados en tubos de ensayo, frascos y cajas de Petri. La **esterilización** del medio de cultivo (realizada comúnmente por medio de autoclaves, sin importar si es sólido o líquido) y la de la cristalería y objetos usados son necesarias para matar microbios contaminantes. Después de la esterilización, el medio puede ser inoculado con esporas o hifas del hongo que se desea hacer crecer; el cultivo es después incubado bajo las condiciones requeridas [1-3, 5].

Aún en medios que proporcionen pequeñas cantidades de nutrientes y en condiciones de crecimiento extremas, los hongos pueden llegar a crecer; es decir, tienen la capacidad de adaptarse, resistir y sobrevivir, lo cual nos hace tener la expectativa de que el hongo pueda crecer, vivir e interaccionar en ambientes inorgánicos inadecuados o no ideales para su crecimiento. Tales características de los hongos hacen que podamos emplearlos como bioplantillas vivas, es decir, que podamos obligarlos a crecer en un medio no muy favorable para ellos y con un mínimo de requerimiento nutricional, en el cual se encontrarán las NPs metálicas que se desea ensamblar en las hifas del hongo crecido. Es decir, esperamos que

los hongos crezcan en un medio coloidal que tenga agua, como medio continuo, y NPs metálicas, como medio disperso.

En cuanto a las bioplantillas utilizadas en este trabajo, se ha reportado que las especies del género *Trichoderma* tienen una gran capacidad enzimática, es decir, producen una gran variedad de enzimas, dependiendo del medio donde se encuentren, y por eso podrán crecer fácilmente en diversos medios con diferentes nutrientes. Por otro lado, las especies de *Aspergillus* no tienen la misma capacidad enzimática que las anteriores, por lo que su crecimiento será más limitado. En cuanto a la temperatura, ambos hongos son mesófilos, por lo que pueden crecer a temperatura ambiente. Los valores de pH adecuados para el crecimiento de los hongos *Trichoderma sp.* van de 4 a 9, y, para las especies de *Aspergillus*, de 5 a 9 [1-3,5]. Existen pocos trabajos que reporten todos estos valores relativos a la temperatura y al pH de ambos hongos. Sin embargo, los valores asentados están respaldados por el trabajo realizado para elaborar esta tesis.

En la tabla 2.3, se presentan las características y requerimientos generales de las dos especies de hongos que hemos utilizado como bioplantillas para el ensamble de NPs metálicas.

Tabla 2.3. Características y requerimientos generales de los hongos usados en el presente trabajo.

Bioplantilla	Diámetro promedio de hifa	Grupo taxonómico	Capacidad enzimática *	Temperatura del medio	pH del medio
<i>Trichoderma</i> sp.	4 a 8 µm	Ascomycota	Alta	20-38 °C	4 a 9
<i>Aspergillus</i> sp.	2 a 5 µm	Ascomycota	Normal	18 a 40 °C	5 a 9

* Respecto a la mayoría de los hongos reportados.

Bibliografía

- [1] J. Deacon. *Fungal Biology*. Blackwell Publishing, Reino Unido, 2006.
- [2] E. Moore-Landecker. *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall, Inc., Nueva Jersey, 1996.
- [3] K. Walker, H. Skelton y K. Smith. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Cutaneous Pathology* **29**, 616-618, 2002.
- [4] L. Zhao, D. Schaefer, H. Xu, S. J. Modi, W. R. LaCourse y M. R. Marten. Elastic properties of the cell wall of *Aspergillus nidulans* studied with atomic force microscopy. *Biotechnology Progress* **21**, 292-299, 2005.
- [5] D. H. Griffin. *Fungal Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. Publications, Nueva York, 1994.
- [6] M. Bernard y J. P. Latgé. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and Biosynthesis. *Medical Mycology* **39**, 9-17, 2001.
- [7] C. G. Ikechi-Nwogu y E. N. Elenwo. Comparative evaluation of growth media for the cultivation of fungal cultures. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* **3**:139, 2012. doi:10.4172/2157-7471.1000139 2012.

Capítulo 3

Biosíntesis de nanopartículas metálicas

De las nanopartículas de diversos materiales, aquellas que han tenido más aplicaciones e influido más en la vida de los seres humanos son las nanopartículas metálicas. La inmensa importancia de las nanopartículas metálicas y de sus aplicaciones son fuertes motivaciones que llevan a explorar nuevas técnicas para su síntesis. Como se mencionó en el capítulo de antecedentes (capítulo 1), la *biosíntesis* de nanopartículas metálicas (NPs-M) es considerada, en la actualidad, un método de síntesis eficiente, que ha ganado terreno en diversos campos de la investigación y en las aplicaciones debido a las bondades y características únicas de los nanomateriales inorgánicos que se sintetizan con ella. El uso de reductores y estabilizadores de origen biológico o *verde* en la síntesis coloidal de NPs-M es la clave de la alta biocompatibilidad de estas. En la mayoría de los casos, no se sabe con exactitud cuál es el compuesto biológico responsable de la reducción y la estabilización; y tampoco, cuál es el mecanismo de tales procesos. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido extraordinarios.

En este capítulo se describirá un proceso de síntesis que es fácil, barato, amigable con el medio ambiente y potencialmente aplicable para preparar NPs de oro (Au), plata (Ag) y zinc (Zn); en este proceso se utiliza la β -D-glucosa (DG) o el extracto de papa (EP) como reductores y estabilizadores únicos. También se describirá el análisis relacionado con el valor del pH de la solución y se propondrán los mecanismos de reducción y estabilización que ocurren en la biosíntesis de las NPs-M.

3.1. Biosíntesis coloidal de NPs-M (Au, Ag y Zn)

La idea de trabajar con EP y DG surgió del hecho de que estos son los nutrientes más utilizados en los cultivos artificiales de hongos. Por eso se comenzó a explorarlos, pues no solamente se pretendía realizar la biosíntesis de NPs, sino que además se deseaba que el medio en donde se sintetizaran las NPs fuera también apto para el crecimiento de las bioplantillas; es decir, que les aportara los nutrientes necesarios y tuviera las características adecuadas para su crecimiento. Todo esto se realizaría en un medio coloidal (medio de cultivo líquido) para promover y facilitar la adhesión de las NPs a las bioplantillas.

3.1.1. Biosíntesis de NPs-Au utilizando extracto de papa

La papa amarilla (*Solanum tuberosum*) es utilizada en diferentes medios de cultivo artificiales debido a que es una rica fuente de carbohidratos (el nutriente principal de las bioplantillas). Está compuesta de granos de almidón (diámetros de 10 a 100 μm) que, a su vez, están constituidos mayormente por dos polímeros orgánicos: amilosa, alrededor de un 20%, y amilopectina, alrededor de un 80 % (ver Fig. 3.1). El porcentaje de estos polímeros depende de la especie del tubérculo. Ambos polímeros están constituidos por unidades de D-glucosa (ver Fig. 3.2).

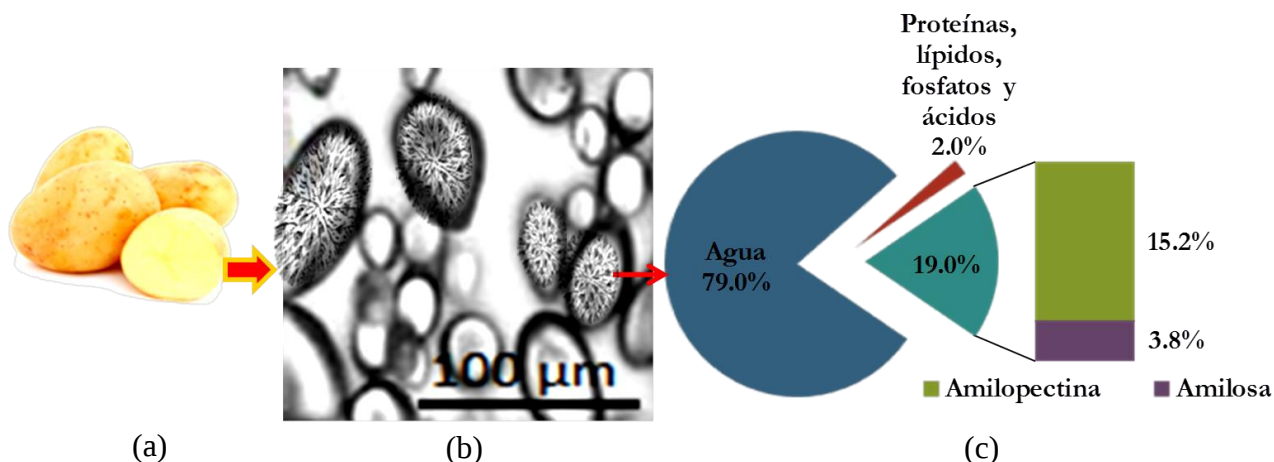


Figura 3.1. (a) Imagen de *Solanum tuberosum*, (b) micrografía de los granos de almidón de la papa y (c) distribución de los diferentes componentes de la papa y de los constituyentes principales del almidón (amilosa y amilopectina).

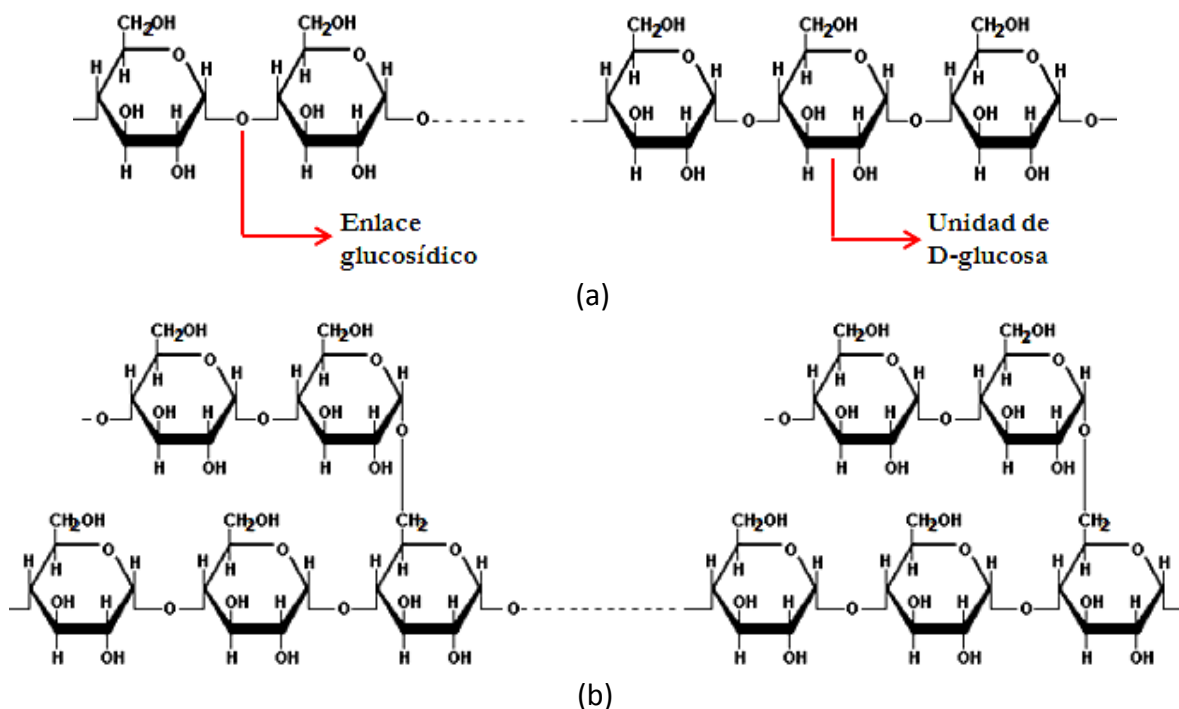


Figura 3.2. Estructura química de los polisacáridos (a) amilosa (cadena lineal formada por unidades de $\alpha(1,4)$ D-glucosa) y (b) amilopectina (cadena lineal de $\alpha(1,4)$ D-glucosa con ramificaciones $\alpha(1,6)$ D-glucosa).

Preparación del extracto de papa (EP)

Para obtener el EP se llevó a cabo el siguiente proceso: se pesaron 50 gramos de papa con cáscara, cortada en cubos, y se adicionaron a 100 ml de agua desmineralizada contenidos en un vaso de precipitado. La mezcla fue hervida a 95 °C durante 5 minutos y, después, se dejó enfriar. La solución obtenida fue filtrada usando pellón (tamaño de malla alrededor de 500µm) y, luego, esterilizada utilizando una autoclave (PRESTO) a 115 °C y 10 psi. El resultado es nuestro EP. Al final del proceso, el EP fue guardado en un refrigerador para su uso posterior.

Síntesis de las NPs-Au

Con el fin de determinar si el EP tiene propiedades reductoras y/o estabilizadoras, al principio se depositó directamente el precursor metálico de Au en diversas cantidades de EP (10, 20 y 30 ml). Los cambios de color resultantes de la solución y las mediciones de absorción nos indicaron que el EP realmente tiene carácter reductor y estabilizador. Una vez determinado esto, se hicieron pruebas similares, pero diluyendo el EP en agua desionizada (ADI) a distintas concentraciones, para estudiar cómo influyen las variaciones de nuestro reductor y estabilizador (EP) en la formación y crecimiento de las NPs-Au y, subsecuentemente, en el crecimiento de las bioplantillas. El procedimiento utilizado se describe a continuación más detalladamente.

Se prepararon soluciones de x ml de EP en $(20 - x)$ ml de ADI con $x = 1.0, 2.0, 3.0$ y 5.0 . Partiendo de cada una de estas soluciones, se prepararon muestras agregándoles 0.5 ml de solución acuosa de iones de Au ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ @ 5mM). Todas las muestras fueron preparadas a temperatura ambiente ($TA \approx 25^\circ\text{C}$) sin agitación (Fig.3.3); se midió el pH y todas fueron ácidas (ver tabla de la Fig.3.9(a)). Se mantuvieron en la oscuridad para evitar

alguna reacción química debido a la radiación externa. Las muestras fueron etiquetadas de acuerdo a su contenido de EP (x ml) como 1EP, 2EP, 3EP y 5EP (ejemplo: 1EP se refiere a la muestra preparada con la solución de 1 ml de EP y 19 ml de ADI y los 0.5 ml de solución acuosa de iones de Au).

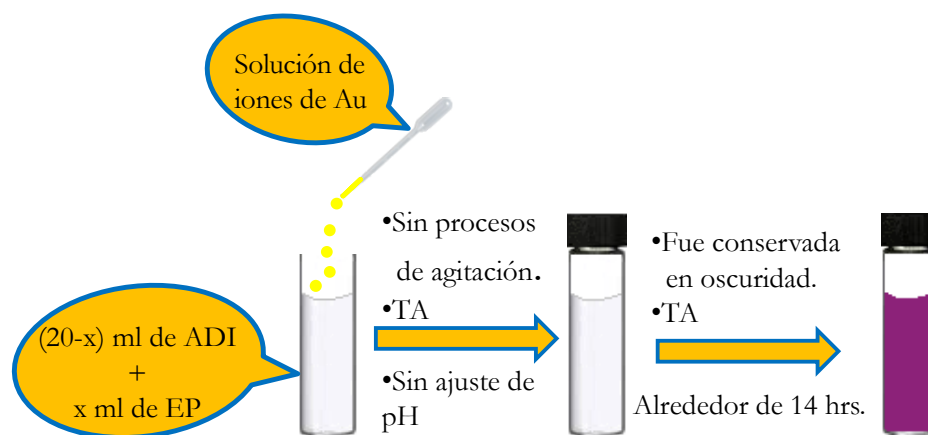


Figura 3.3. Presentación esquemática del proceso de preparación de la solución coloidal de NPS-Au.

Después de la formación y el crecimiento de las NPs-Au, las soluciones coloidales fueron probadas para determinar si los subproductos obtenidos después de la síntesis y el medio resultante eran aptos o no para el crecimiento y desarrollo de los hongos, y corroborar, además, que las nanopartículas no son tóxicas para el hongo. La prueba se realizó por inoculación de esporas de los hongos en la solución y observando el crecimiento de los hongos.

3.1.2. Biosíntesis de NPs-M (Au, Ag y Zn) utilizando D-glucosa

En esta síntesis de NPs-M, la β -D-glucosa (Omnichem) fue utilizada como único reductor y estabilizador. Las soluciones coloidales de las NPs-M ($M = \text{Au, Ag, Zn}$) fueron preparadas de la siguiente manera: 30 mg de DG (polvo) fueron vertidos en 20 ml de ADI, a esta solución se agregaron 0.5 ml de iones metálicos de Au ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ @ 5mM),

Ag(AgNO₃ @ 5mM) o Zn(Zn(O₂CCH₃)₂ @ 5mM). Todas las soluciones fueron preparadas a temperatura ambiente, sin agitación, y fueron almacenadas en la oscuridad.

Caracterización de las NPs-M

Todas las NPs-M sintetizadas en este trabajo fueron caracterizadas utilizando técnicas como la espectroscopía de absorción UV-Vis y la microscopía electrónica de transmisión. En algunos casos, la microscopía electrónica de barrido y la espectroscopía de dispersión de energía fueron también usadas.

Para obtener los espectros de absorción de los coloides sintetizados se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis, Shimadzu UV3101PC, de doble haz, con celdas de cuarzo cuadradas de 1.0 cm de longitud de camino óptico. Los espectros de las soluciones coloidales fueron obtenidos a TA en el intervalo espectral de 300 a 800 nm. Con los espectros, podemos determinar cualitativamente la formación, el tamaño, la dispersión de tamaños y la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas al observar la evolución y la forma de la banda de absorción asociada a la resonancia del plasmón de superficie (RPS) de las nanopartículas.

Para determinar cuantitativamente el tamaño y la dispersión de tamaños, así como la morfología y la estructura cristalina de las nanopartículas sintetizadas, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica usando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JEM ARM 200F a 200kV. Para preparar las muestras, se colocó una gota de la solución coloidal sobre una rejilla de cobre (Cu) cubierta de carbón, que después se dejó secar a TA.

Asimismo, para determinar el tamaño y su dispersión, se usó un microscopio electrónico de barrido (SEM) de emisión de campo FE-HRSEM Auriga 3916 de Zeiss. Para la preparación de las muestras, se colocaron gotas de la solución coloidal sobre un sustrato de Si que después se dejó secar a TA.

También se utilizó la técnica de espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS, por las siglas de *Energy Dispersive Spectroscopy*), la cual es una técnica analítica que se utiliza junto con SEM o TEM para determinar la composición elemental (microanálisis) de un espécimen.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Solución coloidal de Au utilizando EP

Se obtuvieron espectros de absorción (Fig. 3.4) de las soluciones preparadas (muestras 1EP, 2EP, 3EP y 5EP) para determinar la formación de las NPs y estudiar también la dinámica de su crecimiento (formación, tamaño, dispersión de tamaños y estabilidad de la solución coloidal). Los espectros fueron obtenidos para diferentes intervalos de tiempo transcurridos después de haber agregado los iones de Au.

Los espectros de absorción para las diferentes soluciones presentan bandas entre 536 y 551 nm, que indican la formación de NPs de Au, ya que estas bandas están asociadas con su RPS [1,2]. En general, la aparición de la banda de la RPS fue apreciada después de 7 hrs de la preparación de las soluciones y, conforme transcurría el tiempo, su intensidad aumentó. Se observa que al incrementar la cantidad de EP, la banda de la RPS se desplaza hacia mayores longitudes de onda (ver Fig. 3.5(a)), de lo que podría pensarse que la presencia de un mayor cantidad de EP induce la formación de NPs de Au de mayores tamaños, con

mayor dispersión, ya que también se observa un ensanchamiento de las bandas de la RPS. Sin embargo, este corrimiento puede ser mayormente atribuido al cambio del índice de refracción n de la solución (constituyentes de la solución) que rodea a las NPs y de los constituyentes que surfactan las partículas, ya que también se ha reportado que, al aumentar el n de una solución coloidal, el pico asociado a la RPS de las NPs se mueve hacia longitudes de onda mayores [1,3]. Entonces, como $n_{EP} > n_{ADI}$, al aumentar el contenido de EP aumentará n y cambiará la posición del pico hacia mayores longitudes de onda. Esta aseveración se verá reforzada por lo que se observa en las imágenes de TEM presentadas más adelante.

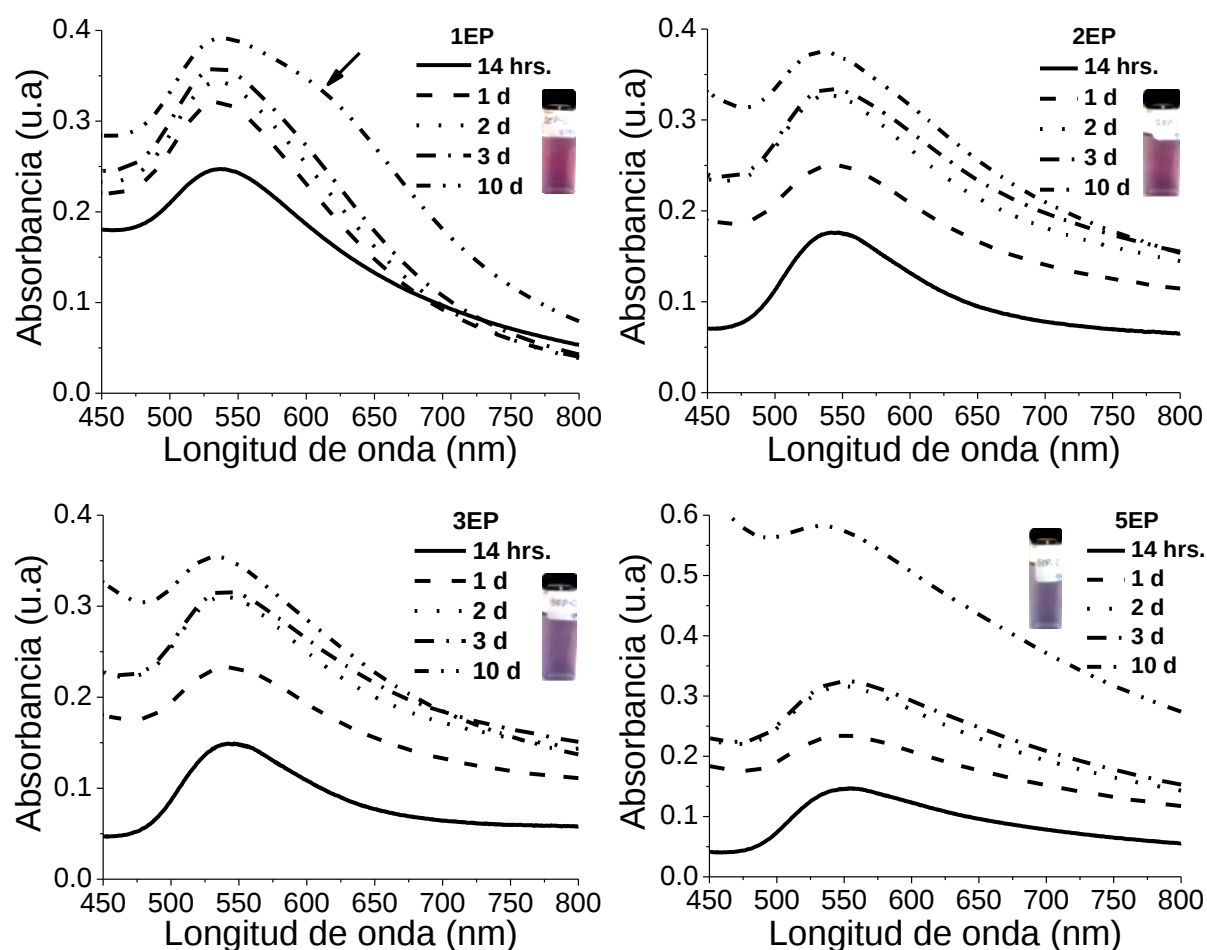


Figura 3.4. Espectros de absorción de las muestras 1EP, 2EP, 3EP y 5EP, adquiridos para diferentes intervalos de tiempo transcurridos (14 horas, 1, 2, 3 y 10 días) después de la

preparación de las muestras. La imagen insertada en cada gráfica es una fotografía de la solución coloidal de Au tomada 10 días después de su preparación.

Aproximadamente 12 días después de la preparación de las muestras, ocurre un ligero corrimiento del pico de la RPS hacia menores longitudes de onda (ver la Fig. 3.5(b)). Se ha reportado que, conforme pasa el tiempo, existe un corrimiento de la banda hacia mayores longitudes de onda debido al crecimiento de las NPs, pero no hacia menores longitudes de onda. Los pequeños corrimientos hacia el azul que presentan nuestras muestras están asociados al cambio gradual en la composición de nuestra solución, debido a los continuos procesos de formación de enlaces (entre moléculas), de estabilización y de reducción que están ocurriendo. Después de 12 días de la preparación de las muestras, algunos de estos procesos disminuyen y las muestras se vuelven estables por más de cuatro meses. Posteriormente, las NPs tienden a aglomerarse.

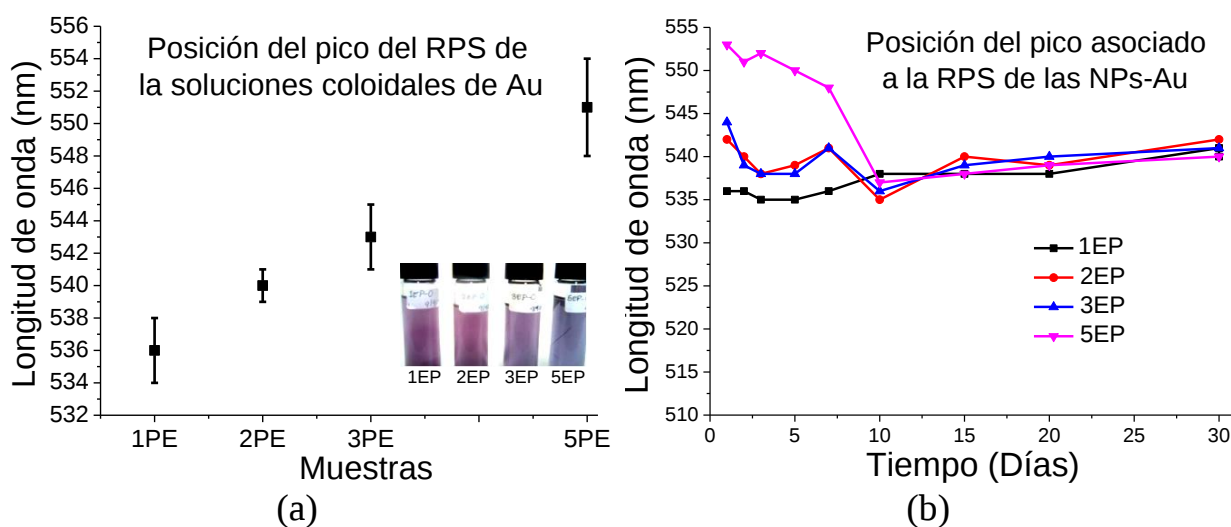


Figura 3.5. Gráficas de (a) la posición del pico de la RPS en función de la cantidad de EP, 14 horas después de la preparación de las muestras, y (b) la posición del pico de la RPS en función del tiempo (días) transcurrido después de la preparación.

Después de estudiar las propiedades ópticas, las muestras fueron analizadas por TEM para observar la morfología, el tamaño y la cristalinidad de las NPs. En la figura 3.6, se presentan imágenes de TEM típicas de NPs-Au adquiridas para diferentes intervalos de

tiempo de crecimiento. En cada imagen TEM se ha insertado el correspondiente histograma de distribución de tamaños de las NPs. Como se puede observar, las NPs-Au tienen forma casi esférica. En la tabla 3.1 se presentan los diámetros promedio de las NPs.

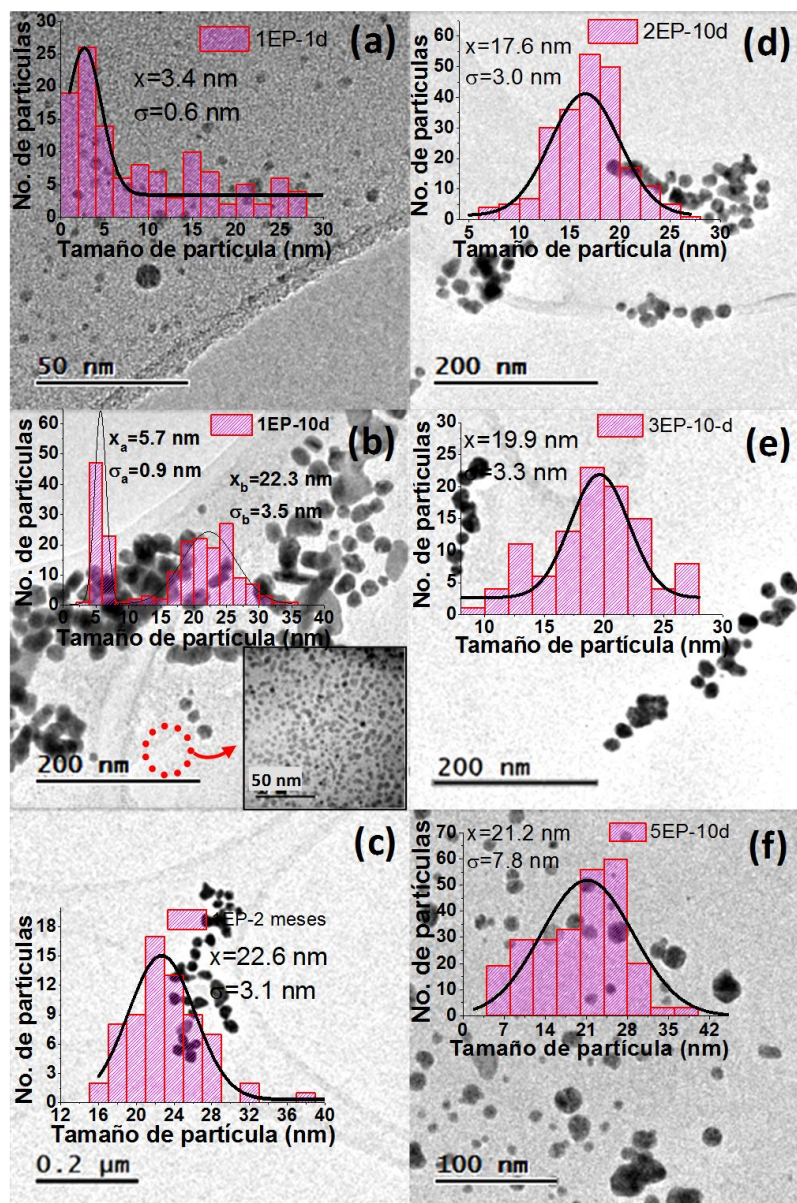


Figura 3.6. Imágenes de TEM típicas de las NPs de Au con sus correspondientes histogramas de distribución de tamaños para las muestras (a)-(c) 1EP (las imágenes fueron adquiridas después de 1, 10 y 60 días de la preparación de la muestra), (d) 2EP, (e) 3EP y (f) 5EP. Para las últimas tres muestras, las imágenes fueron adquiridas 10 días después de su preparación.

Para confirmar la naturaleza química de las NPs-Au se realizó el análisis EDS de ellas. Los espectros EDS de las muestras revelaron líneas de emisión propias del Au (ver Fig. 3.7). Las líneas de emisión de Cu y C reveladas en el mismo espectro son debidas a la rejilla de cobre cubierta de carbono que se usó.

Tabla 3.1. Tamaño promedio de las NPs obtenido a partir de un ajuste gaussiano a los histogramas de distribución de tamaños de las imágenes TEM (obtenidas después de 10 días de la preparación de las muestras).

Muestras	Tamaño de NP-Au	Observaciones
1EP	5.7 ± 0.9 y 22.3 ± 3.5 22.6 ± 3.1	La distribución de tamaños de las partículas es bimodal (rojo). Después de 2 meses ya exhibe una distribución monomodal (negro).
2EP	17.6 ± 3.0	Distribución de tamaños de partícula monomodal.
3EP	19.9 ± 3.3	Distribución de tamaños de partícula monomodal.
5EP	21.2 ± 7.8	Distribución de tamaños de partícula monomodal.

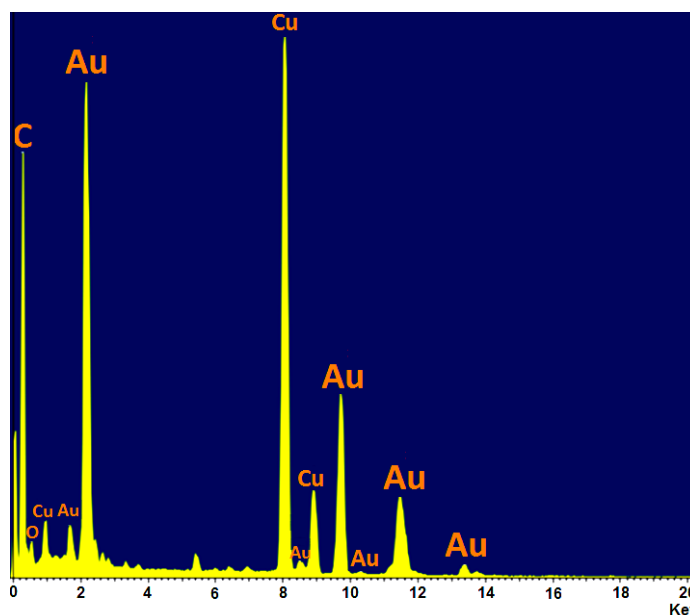


Figura 3.7. Espectro EDS de las NPs-Au que presentan las líneas de emisión propias del Au. Las señales de Cu y C en el espectro aparecieron del soporte (rejilla de cobre cubierta de carbono).

La solución 1EP, a diferencia de las otras soluciones, muestra en su espectro de absorbancia una banda en la longitud de onda de 620 nm (señalada por una flecha en la Fig. 3.4) de menor intensidad que la banda en 536 nm. La imagen TEM, obtenida exactamente el mismo día que el espectro de absorbancia (10 días después de la preparación de la muestra), muestra que los tamaños de las partículas están distribuidos alrededor de dos tamaños (5 nm y 22 nm), por lo que el histograma correspondiente presenta un comportamiento bimodal. Pero, además, se observa la existencia de nanoestructuras elongadas o alargadas (Ver Fig. 3.6(b)) que creemos que son las responsables de la aparición del hombro situado en 620 nm en los espectros de absorbancia, debido a su contribución plasmónica [2]. De los histogramas de dispersión de tamaños observamos que el tamaño promedio de las nanopartículas aumenta con el aumento del contenido de EP en la solución de reacción. En el caso especial de la muestra 1EP, el tamaño promedio de las nanopartículas fue el menor, durante los primeros días después de la síntesis, pero después aumentó por agregación de las nanopartículas, al no estar bien estabilizadas debido a su alta energía superficial.

La contribución al corrimiento del pico de la RPS hacia mayores longitudes de onda debida al aumento en el tamaño de partícula al aumentar la cantidad de EP no puede ser del todo descartada, ya que, como lo muestra el análisis de las imágenes de TEM (obtenidas después de 10 días de la preparación de las muestras), existen pequeñas diferencias entre los tamaños promedio de las nanopartículas obtenidas en las cuatro soluciones coloidales. Estas diferencias llegan a ser como máximo de alrededor de 5 nm. Esta diferencia de tamaño no es tan grande como para desplazar la banda de absorción tanto como ocurrió en nuestros espectros de absorción. Por lo tanto, el cambio de posición del pico de la RSP es principalmente provocado por el aumento del n (índice de refracción) del medio. Así

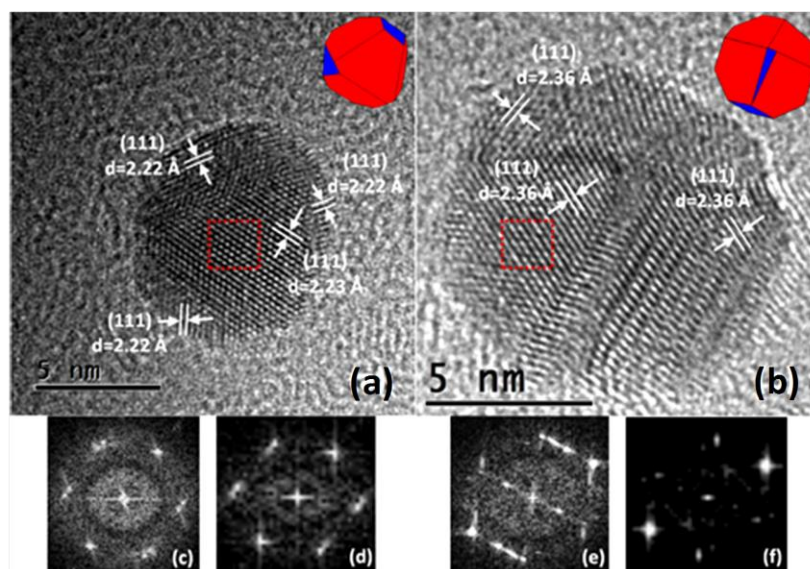
también, la dispersión de los tamaños aumenta conforme la cantidad de EP aumenta (como mencionamos anteriormente), como lo muestra el análisis de las imágenes de TEM.

En la figura 3.8 se muestran imágenes TEM de alta resolución (HRTEM) de las nanopartículas coloidales de Au y sus correspondientes patrones de Transformada Rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés). Las imágenes fueron obtenidas 10 días después de la preparación de las muestras. Las NPs-Au sintetizadas son de naturaleza cristalina y presentan defectos de crecimiento y/o estructurales. Las figuras 3.8(1a) y 3.8(1b) presentan dos partículas representativas de 1EP de tamaños de 8 y 10 nm, respectivamente. Ambas partículas tienen forma octaédrica truncada (como lo ilustran los poliedros insertados en (1a) y (1b)) y exhiben caras cristalinas, con distancia interplanar de 2.3 Å, que corresponden al plano (111) de la fase cúbica fcc del Au (JCPDS #04-0784). El patrón FFT (Fig. 3.8(1c)) de la imagen de toda la primera partícula expone la existencia de defectos de tipo macla (*Twin*, puntos de difracción adyacentes) y de espaciamiento interplanar reducido cerca de las fronteras de grano, indicando la presencia de tensión. El patrón FFT (Fig. 3.8(1d)) del área seleccionada de la imagen (1a) exhibe la deformación de puntos de difracción que indican distorsión de la red. La segunda partícula (1b) presenta múltiples maclas, que forman los bordes octaédricos, y fallas de apilamiento, que son revelados en el espectro FFT (Fig. 3.8(1e)). El patrón FFT (Fig. 3.8(1f)) del área seleccionada de la partícula (1b) muestra el apilamiento de los planos (111). En las figuras 3.8(2a) y 3.8(2b) se muestran dos partículas de forma icosaédrica distintivas de 2EP (que se ilustran mediante los icosaedros insertados en la figura) de tamaños de alrededor de 17 y 15.6 nm, respectivamente. Estas NPs-Au presentan distancias interplanares de 2.3 y 2.0 Å asociadas a los planos cristalinos (111) y (200), respectivamente. Cada borde de estas NPs genera un

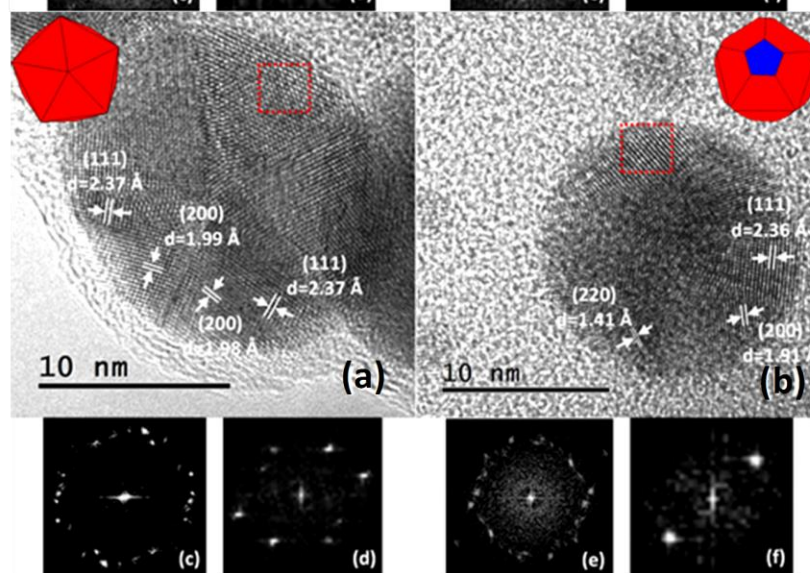
defecto de tipo macla, por lo que estas partículas son también llamadas nanocristales de macla cíclica quintuple. El patrón FFT de la imagen de la partícula presentada en (2a) tiene las características de un patrón de difracción de una NP icosaédrica (Fig. 3.8(2c)), y su patrón FFT (Fig. 3.8(2d)) del área seleccionada demuestra la presencia de los dos planos (111) y (200). La partícula (2b) también es de forma icosaédrica (patrón FFT) pero truncada. Además de hallar los dos planos mencionados, también se encuentra la presencia del plano cristalino (220) con distancia interplanar de 1.4 Å. El patrón FFT de la partícula (2b) también exhibe características de una partícula icosaédrica con defectos estructurales y de crecimiento de la red debido a su naturaleza truncada (Fig. 3.8(2e)). En el patrón FFT (Fig. 3.8(2f)) del área seleccionada de (2b) se tiene la presencia del plano (111). En las figuras 3.8 (3a, 3b) y 3.8 (4a, 4b) se aparecen NPs-Au distintivas de 3EP y 5EP, respectivamente. En ambas muestras se encontró mayormente la presencia de NPs de naturaleza policristalina y con defectos de macla y de apilamiento. La naturaleza policristalina de las NPs se aprecia claramente en los patrones FFT de cada NP (Figs.3.8 (3c, 3e, 4c y 4e)). En ellos, los puntos de difracción están muy cerca unos de otros y forman un anillo.

En general, se obtuvieron NPs-Au constituidas por granos cristalinos con contribución de planos (111), (200) y (220) correspondientes a la fase cúbica fcc del Au. La presencia de estos planos, que son facetas de bajos índices de Miller, se debe a que son más estables que otros planos, gracias a su denso empaquetamiento atómico, lo cual, a la vez, induce a la formación de estructuras poliédricas.

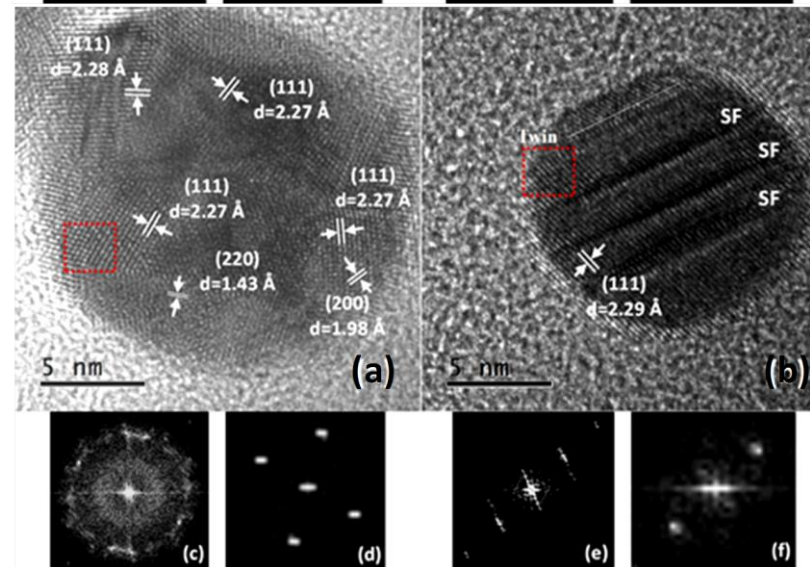
(1)



(2)



(3)



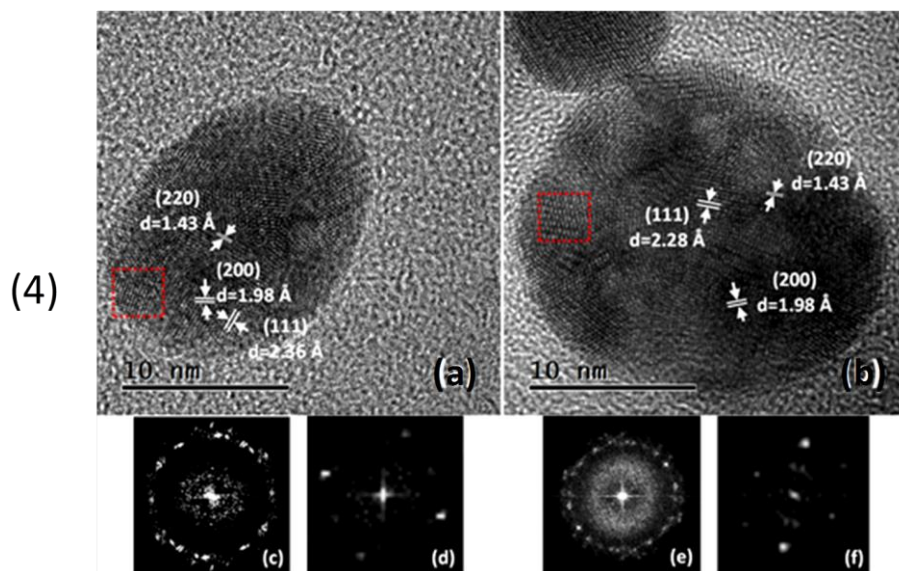


Figura 3.8. Imágenes típicas de HRTEM de las NPs-Au sintetizadas y los patrones FFT correspondientes. Las imágenes 1a y 1b muestran dos NPs cristalinas típicas de 1EP, de tamaños de 8 y 9 nm y de forma octaédrica truncada, con facetas formadas por planos (111). Las imágenes 2a y 2b muestran dos NPs de 2EP, cristalinas, de tamaños de 17 y 15.6 nm y de forma icosaédrica con facetas constituidas por planos (111) y (200). Las imágenes 3a, 3b muestran NPs típicas de 3EP, policristalinas, de tamaños de 18 y 13 nm. Las imágenes 4a y 4b muestran NPs de 5EP, policristalinas y de tamaños de 15 y 21 nm. Las NPs presentaron defectos estructurales y/o de crecimiento apreciables en las imágenes HRTEM y en sus respectivos patrones FFT. Las imágenes 1c, 1e, 2c, 2e, 3c, 3e, 4c y 4e son patrones FFT de toda la NP y 1d, 1f, 2d, 2f, 3d, 3f, 4d y 4f son patrones FFT del área seleccionada en cada imagen HRTEM.

En resumen, las muestras 1EP y 2EP produjeron NPs cristalinas de Au casi esféricas, de formas poliédricas y tamaños entre 5 y 22 nm. Estas dos muestras son las muestras más estables y las NPs tienen menor dispersión de tamaños. Las NPs-Au de las muestras 3EP y 5EP son de forma casi esférica, policristalinas, y de tamaño promedio ligeramente mayor que el de las dos primeras. Estas muestras son menos estables y la dispersión de tamaños de las NPs es mayor.

3.2.1.1. Mecanismos de reducción y estabilización

El éxito que se ha obtenido con el EP como reductor y estabilizador es debido a la presencia de moléculas de DG o cadenas de DG que exhiben su grupo aldehído (es decir,

que este no se encuentra enlazado a ninguna otra molécula). Se sabe que gracias a la presencia de este grupo, la DG es un reductor de iones metálicos, como lo demuestran las pruebas de Tollens y Benedic [4]. A continuación se expondrán y discutirán los mecanismos de reducción y estabilización que dieron paso a la formación de las NPs-Au.

Durante el calentamiento de los trozos de papa en agua desionizada (ver sección 3.1.1), los granos de almidón se hinchan y se rompen, y el almidón es separado, por lixiviación, en los polisacáridos que lo componen: amilosa y amilopectina. También se obtienen cantidades reducidas de DG (debido a que durante el calentamiento se llegan a romper algunas cadenas de los polisacáridos). Cuando esta solución es filtrada y sometida a un proceso de esterilización (en una autoclave a 110 °C y 10 psi), las cadenas de amilopectina y amilosa continúan rompiéndose, proporcionando cada vez más moléculas de DG y cadenas más cortas de ambos polisacáridos (debido a la energía a la que son sometidas las moléculas) que exhiben su grupo aldehído [5,6]; queda así disponible este grupo que actúa como agente reductor. El pH del EP obtenido (constituido por monómeros de D-glucosa y cadenas cortas y largas de amilosa y amilopectina) juega un papel importante en el proceso de estabilización, aunque no influye de manera notable en el tamaño de las NPs, a pesar de que esta característica está directamente relacionada con el proceso de reducción.

En la figura 3.9, se exponen los valores de pH medidos para las soluciones xEP ($x=1, 2, 3, 4, 5$ mL) antes y después de verter los iones de Au en la solución de EP. El valor medido del pH del EP fue de alrededor de 6 y el del ADI fue de 6.5.

(a)

Muestras	1EP	2EP	3EP	5EP
pH (1)	6.33 ± 0.02	6.28 ± 0.02	6.20 ± 0.03	6.10 ± 0.02
pH (2)	3.86 ± 0.03	4.28 ± 0.02	4.57 ± 0.02	4.97 ± 0.04

(1) Antes de añadir los iones de Au;

(b)

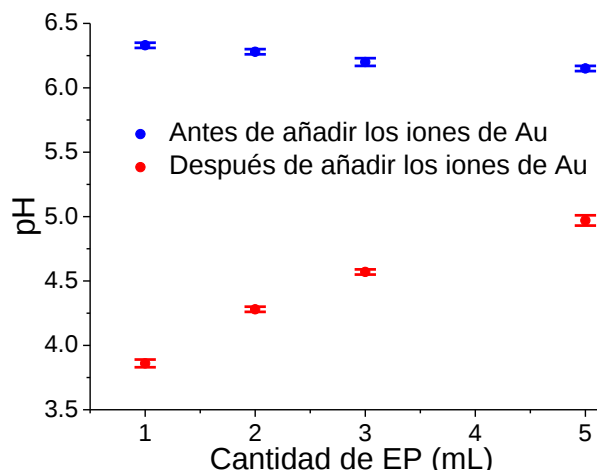


Figura 3.9. (a) Tabla que expone los valores de pH medidos de las diferentes muestras preparadas variando la cantidad de EP, antes y después de verter los iones de Au. (b) Gráfica de la variación del pH de acuerdo a la cantidad de EP, antes (puntos azules) y después (puntos rojos) de verter los iones de Au.

Antes de verter la solución de iones metálicos en las soluciones xPE, observamos que la solución se vuelve más ácida por adición de mayor cantidad de EP; como es de esperarse, ya que $pH_{EP} < pH_{ADI}$. Así, al incrementar la cantidad de EP y disminuir la de ADI, baja el pH de la solución. Al verter la solución de iones de Au (solución ácida con valor de pH de alrededor de 2.5) en cada una de las soluciones xPE, se esperaba que las soluciones xPE más ácidas se volvieran aún más ácidas. Pero nuestros resultados muestran lo contrario (Fig. 3.9). Esto es debido a que en la solución de iones de Au (agua + ácido cloroáurico) se forman iones $[ClAu]_4^-$ y H^+ , y estos últimos hacen que la solución sea ácida. En la solución final (iones de Au+EP+ADI), los iones H^+ tienden a enlazarse con los átomos de oxígeno de los enlaces glucosídicos. Rompen así las cadenas de amilosa y amilopectina y liberan moléculas de DG y moléculas de DG ionizadas positivamente (Ver Fig.3.10), como se menciona en los reportes sobre las hidrólisis ácidas de diferentes polisacáridos [7]. Por lo tanto, a mayor cantidad de EP, existe un mayor número de enlaces glucosídicos con los que los iones H^+ reaccionan y hacen disminuir así la acidez de la solución.

El mecanismo de reducción de los iones metálicos en la biosíntesis no ha sido establecido con certeza, a pesar de que en bastantes trabajos se han propuesto diferentes reacciones para explicar el proceso. Se ha reportado la reducción de iones de Au por moléculas de DG en un medio ácido, aunque no se dan detalles de las reacciones que se llevan a cabo [8]. Aquí se propone el mecanismo de reducción de los iones de Au por moléculas o cadenas de DGs (de amilosa y amilopectina) que lleva a la formación de las NPs-Au.

En la figura 3.11, se muestra un esquema de los diferentes pasos de la reacción redox. Se parte de una molécula de DG que exhibe su grupo aldehído (encerrado en un círculo verde en la Fig.3.11).

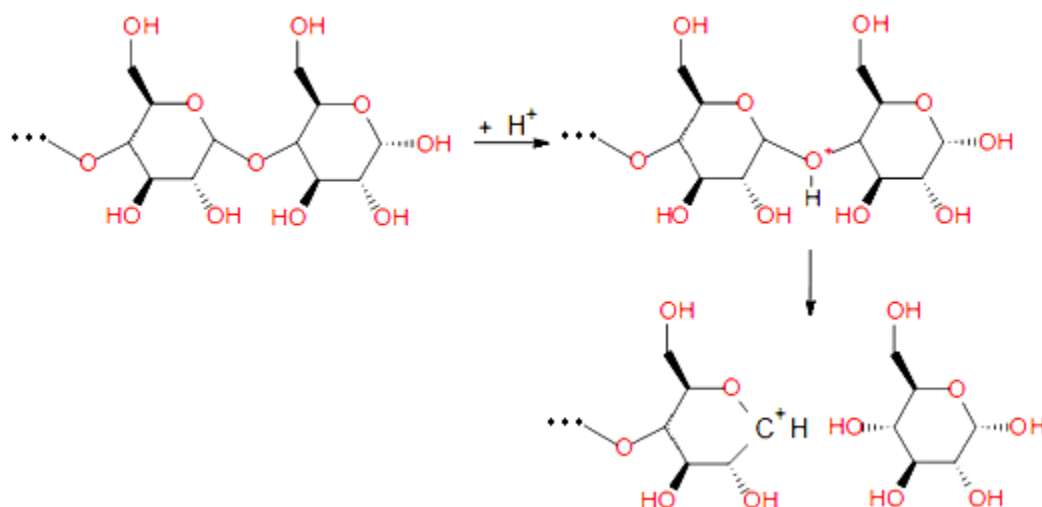


Figura 3.10. Representación esquemática del proceso de la hidrólisis ácida de la amilosa y la amilopectina.

El ion Au^{3+} se enlaza al oxígeno del grupo aldehído (O1) debido a sus electrones libres, por lo que el Au^{3+} es reducido a Au^{2+} por transferencia electrónica desde O1 (Fig. 3.11 paso (1)). El proceso es seguido por la sustitución nucleófila del radical hidroxilo (OH^-) al carbono del grupo aldehído (C1), llevando a C1 a un estado inestable (ya que se encuentra enlazado con cuatro elementos) y, como sucede en este tipo de reacción, el H es removido o

desenlazado del C1, cediendo así un electrón a Au^{2+} y, por lo tanto, reduciéndolo a Au^+ (Fig. 3.11, paso 2 y 3). Este proceso es repetido una vez más para reducir Au^+ a Au^0 y así comienza la formación de las NPs-Au. La oxidación de la molécula de DG en este proceso da como resultado una molécula de ácido D-glucónico (AcDGo).

En lo que se refiere a la estabilización de las NPs, diversos trabajos reportan la presencia de proteínas, aminoácidos y diferentes polisacáridos que serían responsables de estabilizar o surfactar las NPs; aunque no se conoce con certeza el grupo funcional o elementos que se enlazan directamente con la superficie de las NPs.

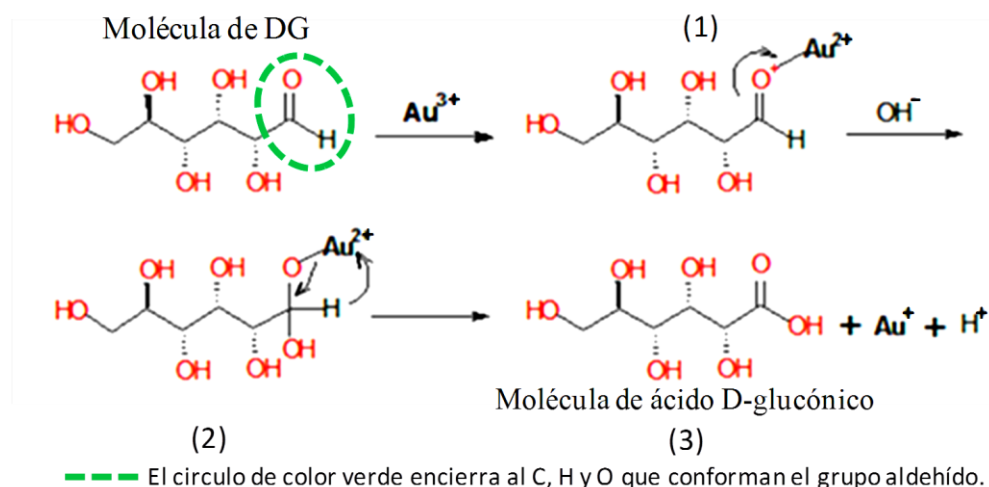


Figura 3.11. Representación esquemática de las reacciones químicas que se llevan a cabo en el proceso de reducción de los iones de Au por el EP. La elipse de color verde encierra los átomos que constituyen el grupo aldehído y que son mencionados en el texto como C1, O1 y H1.

Algunos trabajos similares al nuestro reportan que las moléculas de ácido glucónico surfactan las NPs de Fe y que las moléculas de almidón surfactan las NPs de Au y Ag [9, 10]. En ambos casos, esto sucede gracias a la presencia de grupos hidroxilos (en las moléculas de almidón y ácido glucónico) que se enlazan a la superficie de la NP por interacción electrostática. Es en esta dirección en la que apunta nuestro mecanismo de estabilización, ya que, como fue discutido anteriormente, la solución de EP usada para la

reducción de los iones de Au contiene cadenas cortas y/o largas de amilosa y amilopectina, así como monómeros de DG. Estos monómeros son oxidados a ácido D-glucónico en el proceso de reducción de iones de Au y lo mismo ocurre con las unidades terminales de glucosa de las cadenas de amilosa y amilopectina (Figura 3.12(a)). Estas últimas moléculas son los agentes estabilizadores en nuestra síntesis; ellas surfactan a las NPs-Au a través de la interacción electrostática entre la carga negativa del O de los grupos hidroxilos y la superficie positiva de las NPs-Au. Gracias a esa interacción, las moléculas se enlazan a las NPs-Au (Figura 3.12).

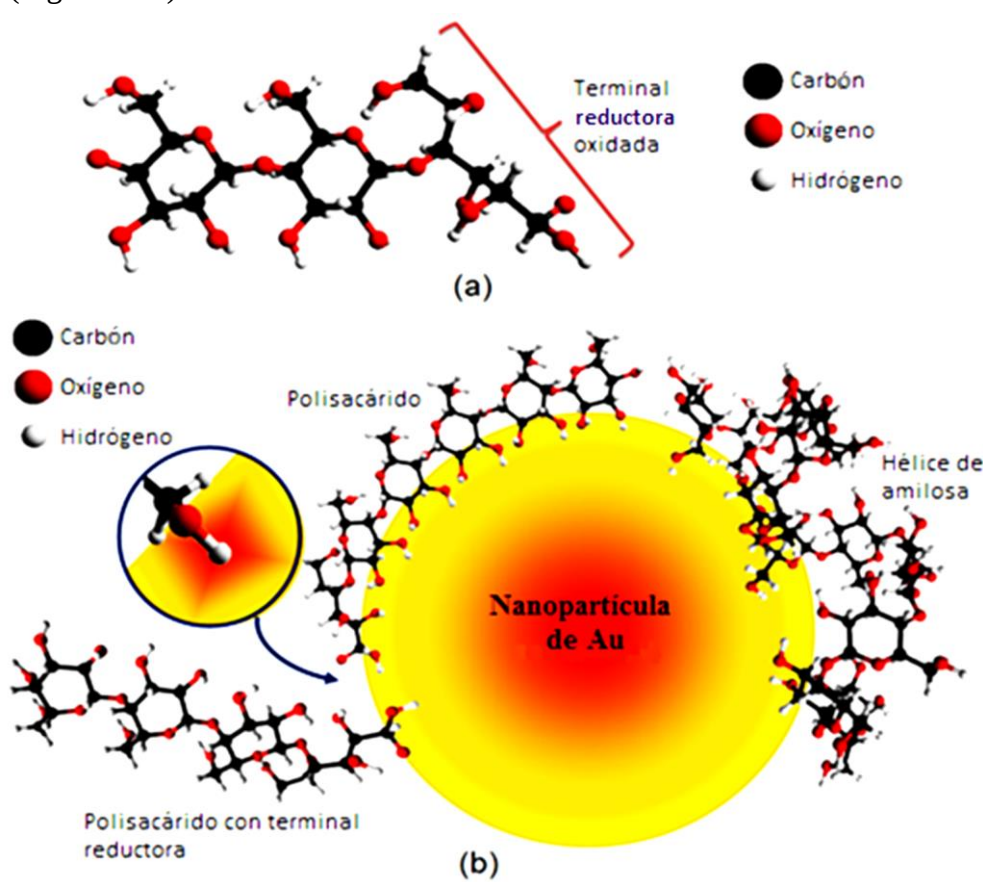


Figura 3.12. (a) Una cadena de polisacárido con terminal reductora oxidada; (b) ilustración esquemática de la adsorción de los polisacáridos en la superficie de una NP-Au, a la que se han enlazado a través de los grupos OH⁻.

Como ya mencionamos, el pH de la solución coloidal varía dependiendo del contenido de EP debido al rompimiento de las cadenas de amilosa y amilopectina. Lo que se esperaría

entonces es que, al tener una mayor cantidad de EP, se tendría una mayor cantidad de agente estabilizador y, por lo tanto, se podría surfactar mejor la superficie de las NPs. Sin embargo, como se observa de los resultados de TEM y de los espectros de absorbancia, la dispersión de tamaños de las NPs es mayor con el incremento de EP. Esto podría deberse a que existe una mayor velocidad de nucleación de las NPs debido una mayor cantidad de reductor en la solución de reacción.

Mientras que el crecimiento y el tamaño final de las NPs son controlados por la interacción electrostática entre la superficie de la NP y los grupos hidroxilos de las moléculas de DG, del ácido D-glucónico y de las cadenas de los polisacáridos, la agregación de las NPs formadas es controlada por posibles interacciones estéricas de los polisacáridos absorbidos sobre la superficie de la NP. Por lo tanto, es importante formar una densa capa de estas moléculas alrededor de las NPs para su estabilización.

Solución coloidal de Au en un medio alcalino

Para estudiar aún más el efecto del pH de la solución en la formación de NPs-Au, se sintetizaron NPs-Au en un medio alcalino (básico), siguiendo un procedimiento similar al de la sección 3.2. La solución se preparó con 1 ml de EP ($x = 1$), 19 ml de ADI y 0.5 ml de iones de Au, es decir, se preparó de igual manera que la muestra 1EP (que resultó ser un medio ácido) solo que en este caso el pH de la solución final fue ajustado a 8 con una solución buffer de referencia 10 (Hidrogenofosfato de disodio, Sigma Aldrich). La solución final fue almacenada de la misma manera que las muestras anteriores. El cambio de color de la solución, característica que indica la presencia de NPs, ocurrió después de 12 horas de su preparación.

Se obtuvieron espectros de absorbancia de la muestra en diferentes momentos de tiempo (ver figura 3.13(a)). La banda de la RPS asociada a las NPs de esta muestra se ubicó alrededor de 535 nm después de 14 hrs de la preparación. Al igual que en las muestras anteriores, se presentó un ligero corrimiento en la posición del pico de la RPS hacia menores longitudes de onda (solo en el caso del espectro adquirido 20 días después de la preparación) asociado, igualmente, a cambios del índice de refracción del medio. A diferencia de lo que ocurre para las muestras sin ajuste de pH e inclusive para la muestra 1EP, esta solución coloidal exhibe bandas de RPS muy bien definidas y más angostas, así como una menor variación en la posición e intensidad del pico RPS con el tiempo de envejecimiento. Esto nos habla de una menor dispersión de los tamaños de partículas y mayor estabilidad, lo cual es evidente, ya que esta solución ha sido estable por más de un año y medio. A diferencia de lo que se obtuvo para la muestra 1EP, que era un medio ácido, el espectro de absorción de la muestra alcalina no revela el hombro en 620 nm aún después de 10 días, lo que nos indica que no existen en esta muestra nanoestructuras elongadas o alargadas.

Se obtuvieron imágenes de TEM y HRTEM para conocer la morfología, tamaño y cristalinidad de las NPs-Au (después de 10 días de preparación de la muestra). La imagen TEM presentada en la Fig. 3.13(b) revela la presencia de NPs de forma esférica. Del histograma de distribución de tamaños (Fig. 3.13(c)), se nota claramente una distribución bimodal, es decir, existen dos grupos de NPs de tamaños promedios de 3.6 ± 0.4 y 23.6 ± 3.7 nm. En las imágenes de TEM no se encontraron estructuras de forma elongada ni alargadas. En la Fig. 3.13(d), se presenta una imagen HRTEM de una NP representativa de esta muestra. En general, las NPs son de naturaleza cristalina y presentan un menor número de

defectos. También aquí es evidente la presencia de partículas pequeñas de 3.6 ± 0.4 nm (señaladas en la figura con flechas rojas).

Como vimos en la sección anterior, las NPs-Au crecidas en un medio básico son más estables que las sintetizadas en un medio ácido. Recordemos que la muestra 1EP (medio ácido) mostró una distribución de tamaños bimodal que con el paso del tiempo (2 meses después de la preparación) se convirtió en una distribución monomodal, por agregación de las NPs pequeñas, debido a su inestabilidad.

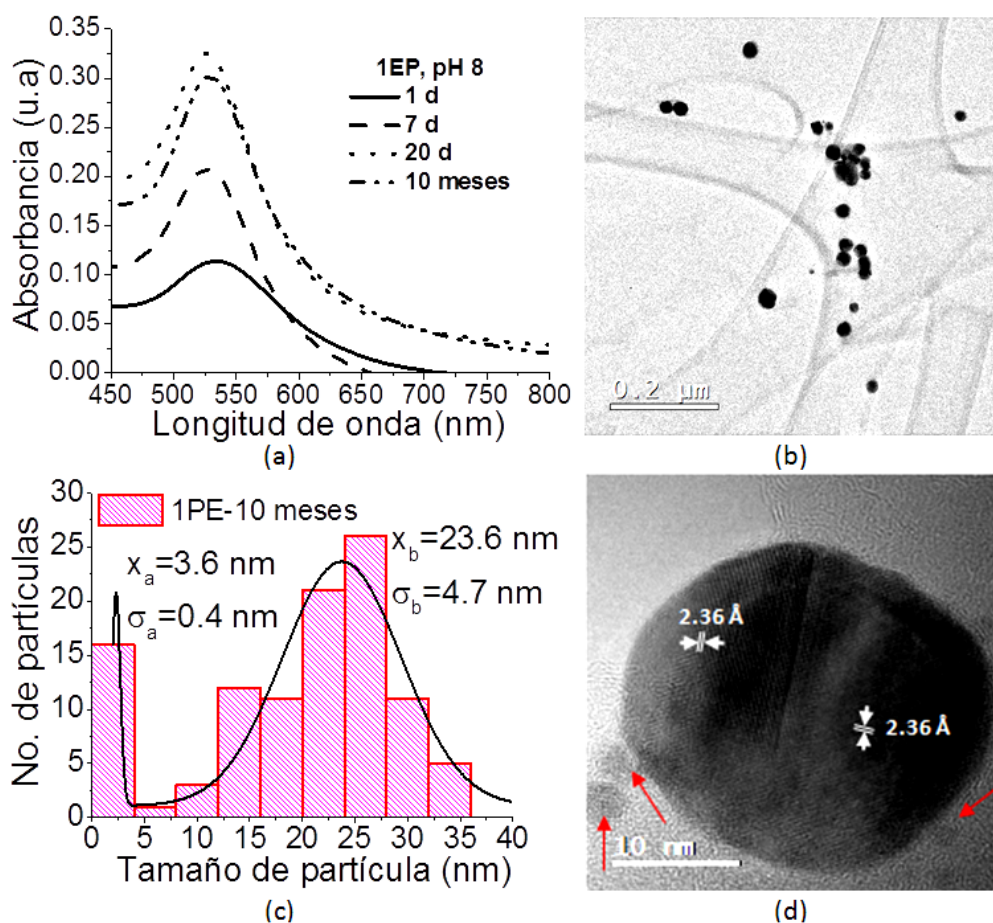


Figura 3.13. (a) Espectros de absorbancia obtenidos en diferentes momentos de tiempo; (b) imagen TEM típica de NPs-Au; (c) histograma de distribución de tamaños; y (d) imagen HRTEM de una NP-Au de 27 nm de tamaño.

Por otro lado, la muestra con la misma concentración de EP, pero crecida en un medio alcalino, mostró también una distribución de tipo bimodal que, sin embargo, no se modificó al pasar el tiempo (ver histograma de distribución de tamaños después de 2 meses, Figura 3.13(c)). Esto indica que el tamaño de las partículas se mantuvo igual desde su formación, debido a que las NPs están mejor surfactadas y a que la interacción estérica en esta muestra es más fuerte o estable.

La gran estabilidad de las NPs formadas en un medio básico puede ser entendida si analizamos los efectos del pH de la solución sobre la estabilidad química de los polisacáridos presentes en la solución. Como se discutió en la sección 3.2.1, la estabilidad de nuestra solución coloidal es controlada por dos interacciones: el control del crecimiento y el tamaño de las NP dependen de la interacción electrostática entre la carga positiva de la NP-Au y la carga negativa del O de los grupos hidroxilo de la glucosa y de los polisacáridos; la aglomeración de las NPs es impedida por la interacción estérica entre los polisacáridos enlazados a las NPs. En el caso de un medio alcalino, la formación de NPs es gobernada por los mismos mecanismos, pero aquí la capa que surfacta las NPs y la interacción estérica son más estables, lo que evita durante tiempos más largos la aglomeración de las NPs. Esto se debe a que en un medio básico la presencia de iones H^+ es mucho menor, por lo que existen más cadenas largas de los polisacáridos pues no ocurre tanto la hidrólisis ácida (esquema de la Fig 3.10) y hay a la vez un menor número de agentes reductores. Esto hace, por un lado, que la razón de reducción sea más lenta, así como la nucleación, dando tiempo a que la superficie de las NPs sea mejor surfactada y, al haber cadenas más largas de polisacáridos sobre la superficie de la NPs, aumenta la interacción estérica.

El uso del EP en la biosíntesis de NPs-Au, que sirve a la vez como agente reductor y estabilizador, tanto en un medio ácido como en un medio alcalino, no ha sido reportado. Se ha reportado, sin embargo, el uso del almidón de papa en la biosíntesis de NPs-Au, pero únicamente como agente estabilizador o surfactante, teniendo que emplear además un agente reductor (pH alcalino).

3.2.2. Solución coloidal de NPs-M usando D-glucosa

Después de la preparación de las muestras con DG como reductor y estabilizador para la síntesis de NPs de Au, Ag o Zn (ver sección 3.1.2), se obtuvieron espectros de absorción para monitorear las bandas asociadas a la RPS de las NPs de cada uno de los tres metales, con el propósito de investigar la formación y la estabilidad de las NPs. Las bandas asociadas a la RPS de las NPs de Au, Ag y Zn fueron localizadas alrededor de 542, 427 y 327 nm, respectivamente (Fig. 3.14). Las imágenes insertadas en cada gráfica muestran el color de la solución coloidal (rojo para el caso de las NPs-Au, amarillo para el de las NPs-Ag y transparente para el de las NPs-Zn, ya que la banda de absorción en este último caso se encuentra en el UV). Estas imágenes fueron adquiridas el mismo día en que se midió el último espectro. La formación de las NPs-Au ocurre después de 10 días de la preparación de la muestra, a diferencia de lo que ocurre para las NPs-Ag, que se forman después de 40 minutos de la preparación (ver Fig. 3.14), lo que muestra que la DG reduce más rápidamente los iones de Ag que los de Au. Las NPs de Zn se forman más rápidamente que las NPs-Au pero más lentamente que las NPs-Ag. Esto nos indica que la DG en solución acuosa y a un pH de 7 es un reductor suave para el Au, moderado para el Zn y fuerte para la Ag.

La banda asociada a la RPS de las NPs de Zn es más angosta que las de Au y Ag, lo que sugiere que hay una menor dispersión de tamaños de las NPs de esta solución. La banda asociada a la RPS de las NPs de Au, Ag y Zn no cambia de posición o intensidad aún después de 24 días (ver Fig.3.14), lo que indica una buena estabilidad de las NPs. Al comienzo de la reacción, las soluciones coloidales se observan más o menos estables ya que la posición de la banda de la RPS no varía considerablemente (en comparación con lo que ocurre en el caso de las síntesis con EP), aunque llega a haber corrimientos muy ligeros de esta banda (ver Fig. 3.14) hacia menores longitudes de onda (mucho menores que los que se observan para las NPs-Au en el caso de síntesis con EP). Esto se debe a cambios en los constituyentes de la solución. Las muestras son estables por más de dos años.

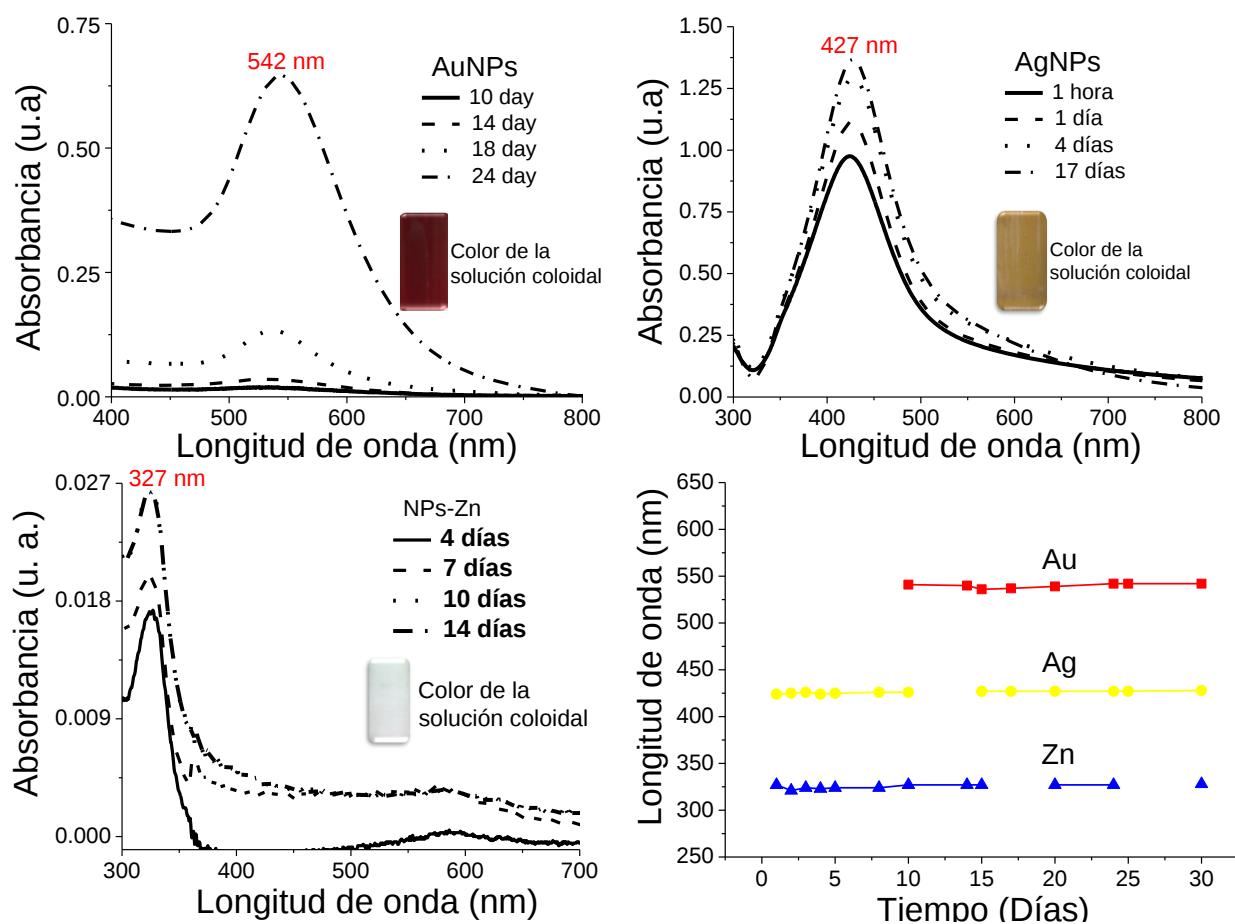


Figura 3.14. Espectros de absorción de las NPs-Au, NPs-Ag y NPs-Zn. La banda asociada a la RPS está localizada alrededor de 542, 427 and 327 nm, respectivamente. La gráfica ubicada en el lado inferior derecho muestra la posición del máximo de las bandas de RPS de las NPs de cada uno de los tres metales en función del tiempo.

El día 24, después de la preparación de las soluciones, se adquirieron imágenes de TEM y HRTEM para observar la morfología, el tamaño y la naturaleza cristalina de las NPs de Au, Ag y Zn. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.15, 3.16 y 3.17, respectivamente. Las figuras 3.15(a) y 3.15(b) son imágenes de TEM de las NPs-Ag. Estas NPs son de forma casi esférica y tienen un diámetro promedio de 38.1 ± 6.2 nm, obtenido del histograma de distribución de tamaños que se ha insertado en la Fig. 3.15(b). El histograma nos muestra, además, la existencia de una notable dispersión de tamaños debido a la presencia de NPs pequeñas (de ~ 5 nm de diámetro, imagen insertada en la Fig. 3.15(a)) y NPs más grandes (de ~ 40 nm de diámetro). Las figuras 3.15(c) y 3.15(d) presentan imágenes de HRTEM y los correspondientes patrones FFT para una NP-Ag representativa de esta muestra. Las imágenes revelan que las NPs son de naturaleza policristalina, pues exhiben claramente las franjas de difracción de la red (Figs. 3.15 (a) y (b)) asociadas a las distancias entre planos cristalinos; así también lo revelan los puntos de difracción de los patrones FFT. Las imágenes de HRTEM y los patrones FFT (Figs. 3.15(c) y (d)) muestran que las NPs están definidas por los planos cristalinos (111) y (200) indexados a la fase cúbica fcc de la Ag (JCPDS #03-0931), con distancias entre planos de 2.29 y 2.04 nm, respectivamente (Fig. 3.15d). La elongación de los puntos de difracción en los patrones FFT y la variación de los valores de las distancias entre planos están relacionados con defectos de apilamiento de la red cristalina de la NP, lo que se puede observar mejor en el patrón FFT de toda la partícula (insertado en el lado inferior derecho de 3.15(c)).

Las figura 3.16(a) y (b) son imágenes de TEM de las NPs-Au con el correspondiente histograma de distribución de tamaños (insertado en 3.16(b)). Se observa que las NPs-Au tienen tamaño promedio de 40.7 ± 5.1 nm y forma arbitraria. Se observa también la presencia de NPs más pequeñas de forma esférica (indicadas por la flecha roja en la Fig. 3.16(a)). Las imágenes de HRTEM (3.16(c) y (d)) y los patrones FFT (Fig.3 (c) y 3(d)) exhiben la naturaleza policristalina de las NPs, definidas por los planos (111) y (200), indexados a los planos de la fase cúbica fcc del Au (JCDs #04-0784), con distancias interplanares de 2.33 y 1.98 Å, respectivamente (Fig. 3.16(d)). Las NPs-Au presentan algunos defectos estructurales, como defectos de apilamiento (señalado en Fig. 3.16(c)) y maclas (Tw); estos últimos pueden ser apreciados en el patrón FFT de toda la partícula (imagen insertada en 3.16(c)), donde se manifiestan como un ensanchamiento de los puntos de difracción.

Las NPs-Zn obtenidas son de forma esférica, tienen diámetro promedio de 4.6 ± 0.8 nm y son monodispersas, como lo revelan las imágenes de TEM (Figs. 3.17(a) y (b)) y el histograma de distribución de tamaños (insertado en la Fig. 3.17(a)). Las imágenes de HRTEM y los patrones FTT (Figs. 3.17(c) y (d)) hacen ver la naturaleza monocristalina de las NPs. Los patrones FFT de la Fig. 3.17(d) son para el área encerrada por el recuadro rojo en la Fig. 3.17(c) y exhiben puntos de difracción referidos a la presencia de un solo plano cristalográfico, indicando así que las partículas son monocristalinas. Algunas partículas están definidas por el plano (100) y otras por el plano (102), con distancias interplanares de 2.88 y 1.95 Å, respectivamente. Estas distancias pertenecen a los planos indexados de la fase hexagonal del ZnO (JCPDS #89-1397) y no al del Zn. En el patrón FFT de toda la imagen (insertado en la Fig. 3.17(c)), se observa solo la presencia de los dos planos

mencionados. Algunas NPs presentan defectos de apilamiento, como se puede apreciar en las secciones 2 y 3 de la Fig. 3.17(d). La discrepancia de los resultados obtenidos en TEM respecto a los obtenidos con los espectros de absorción sugiere que las NPs de Zn sintetizadas (se comprobó su formación con la aparición de la banda de la RPS asociada a NPs de Zn) se oxidan durante el análisis TEM, posiblemente desde la preparación de las rejillas de TEM y, luego, al exponer las NPs a la alta energía del haz de electrones; además de que, por su pequeño tamaño, estas NPs tienden a ser susceptibles a la oxidación.

En resumen, se sintetizaron NPs de Au, Ag y Zn/ZnO de tamaños comprendidos entre 1 y 60 nm. Las NPs-Zn fueron las más pequeñas (de alrededor de 4.6 nm), además de ser cristalinas, monodispersas y de forma esférica. En el caso de las NPs-Au, se obtuvieron partículas policristalinas de forma arbitraria y tamaño promedio de 40.7 nm. Las NPs-Au fueron casi esféricas, policristalinas y de tamaño promedio de 40 nm.

3.2.2.1 Mecanismos de reducción y estabilización

Cuando se diluye en agua una muestra cristalina de DG, se obtienen moléculas de DG simples en forma abierta o en varias formas cerradas (formas cíclicas). Estas formas sufren continuas conversiones de unas en otras y, cuando pasan por la forma abierta, exponen su grupo aldehído. Como se ha reportado, este grupo aldehído es el responsable de la reducción de los iones metálicos [4]. Las moléculas de DG reducirán entonces los iones metálicos (Au, Ag y Zn) de la manera expuesta en la sección 3.2.1.1 (Fig. 3.11).

De los espectros de absorción obtenidos (y del cambio de color de la solución), se observó que la formación de las NPs-Ag ocurre mucho más rápidamente que la de las NPs-Au, lo que nos indica que la reducción de los iones metálicos de Ag ocurre más rápidamente que

la de los de Au. Sin embargo, la Ag tiene un potencial de reducción estándar (a 25 °C y pH=7) menor (0.79 V para Ag^+) que el del Au (1.49 V para Au^{3+}) por lo que se esperaría que el Au fuera más fácilmente reducido [11-14]. Sin embargo, como se ha reportado, el potencial de reducción de los iones metálicos puede ser afectado por el pH de la solución así como por el complejo que estos puedan formar [15].

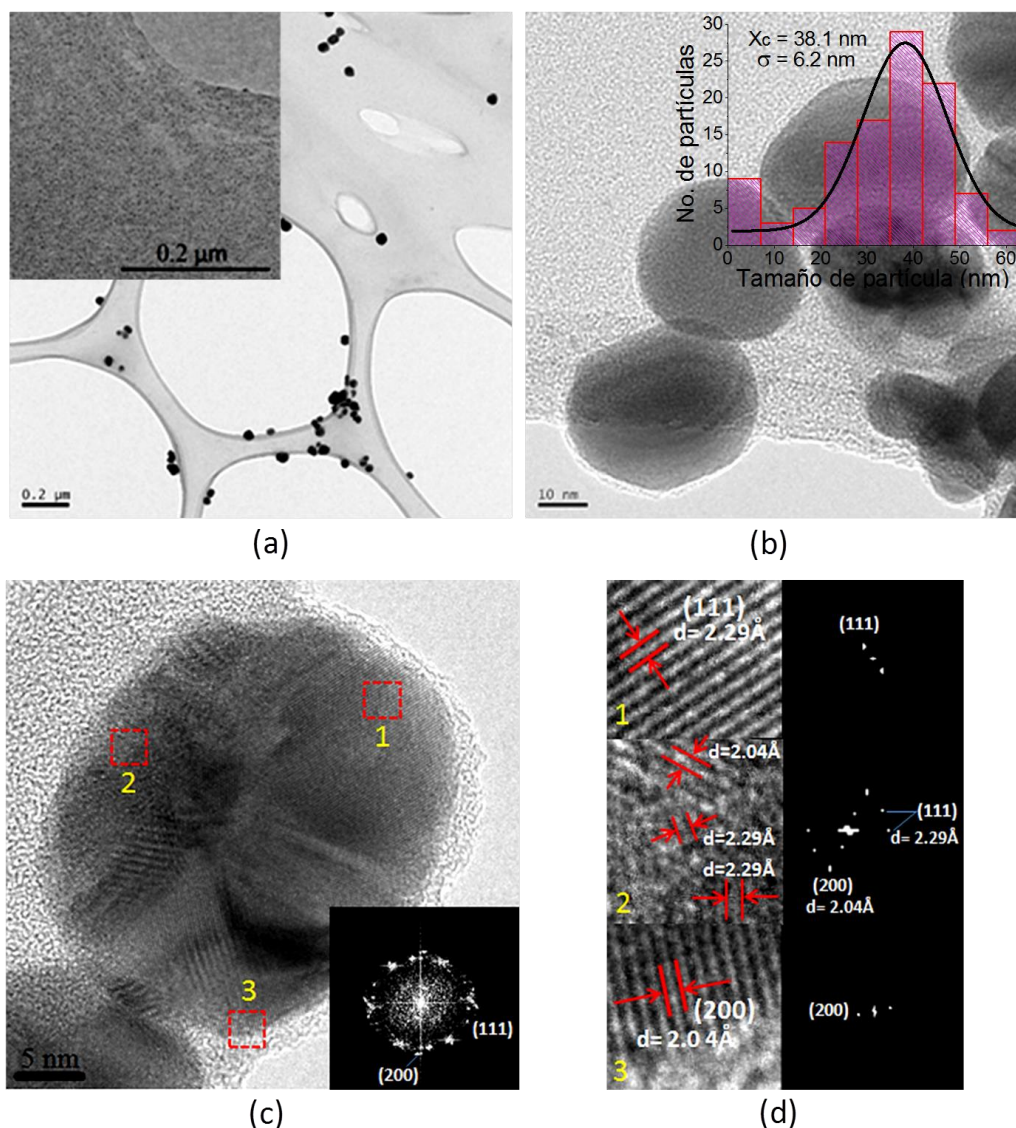


Figura 3.15. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Ag típicas con el correspondiente histograma de distribución de tamaños insertado en (b). La imagen insertada en (a) es una ampliación de una zona de la rejilla. (c) Imagen de HRTEM de una NP-Ag con su respectivo patrón FFT insertado en el lado inferior derecho. (d) Imágenes de HRTEM de las zonas de la NP encerradas por cuadrados rojos en (c), donde se visualizan los planos cristalinos (franjas), y sus respectivos patrones FFT.

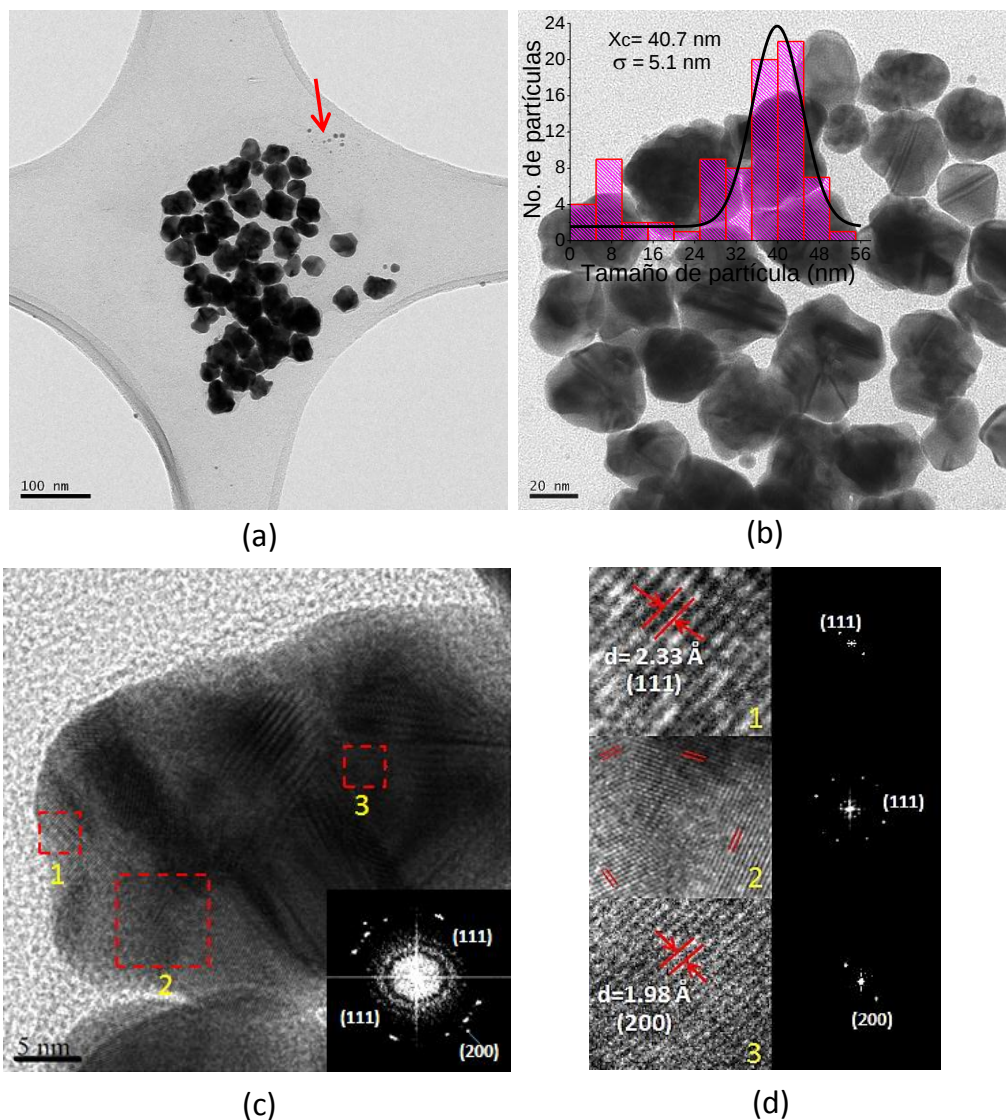


Figura 3.16. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Au con el correspondiente histograma de distribución de tamaños (insertado en a). (c) Imagen de HRTEM de una NP y su patrón FFT (insertado en la misma imagen). (d) Imágenes de HRTEM de las zonas de la NP encerradas por cuadrados rojos en (c) y de los patrones FFT correspondientes. Las NPs-Au están definidas por los planos (111) y (200).

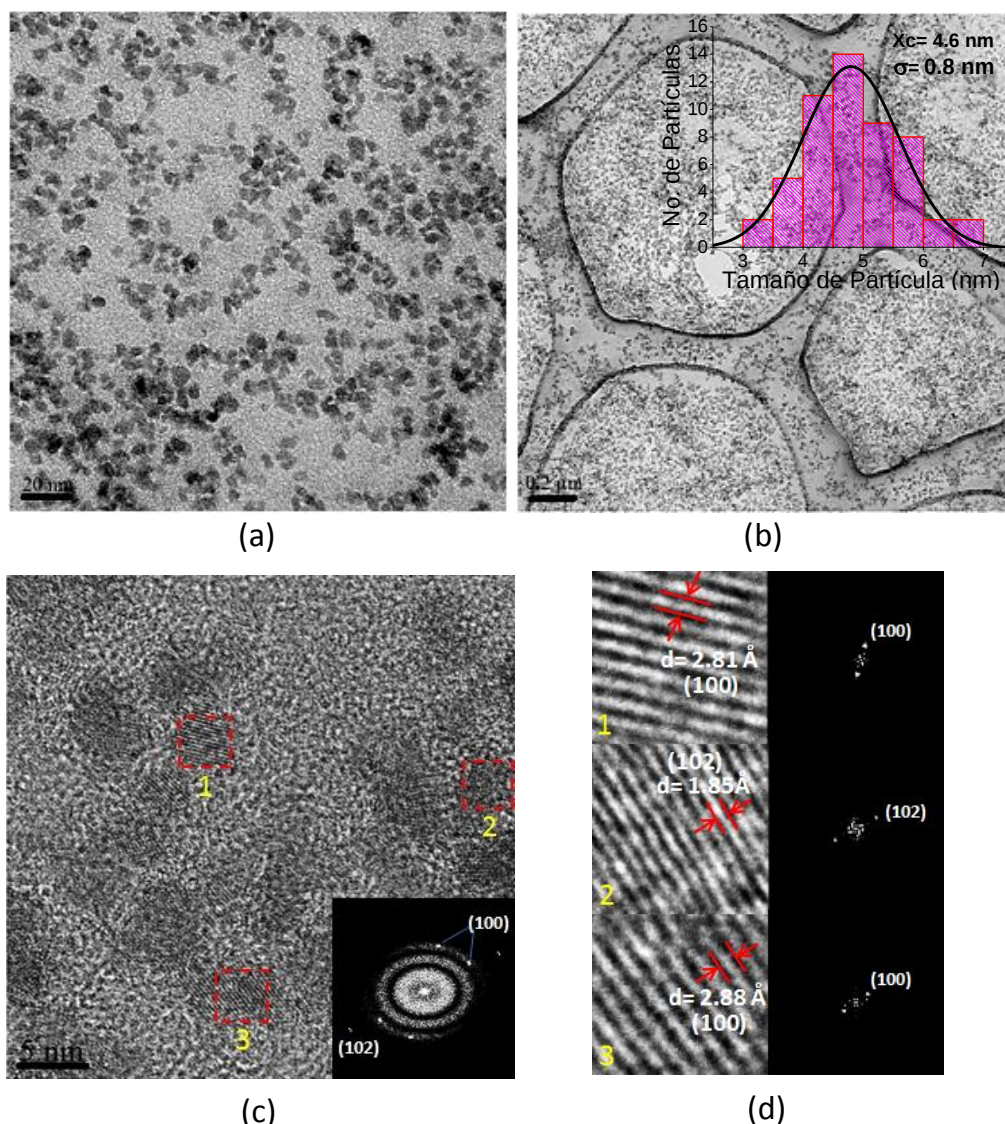


Figura 3.17. (a, b) Imágenes de TEM de NPs-Zn y el correspondiente histograma de distribución de tamaños (insertado en (a)). Las NPs-Zn son monodispersas y de forma esférica y tienen diámetro promedio de 4.6 nm. (c) Imágenes de HRTEM y su patrón FFT (insertado en la misma imagen). En estos últimos se identifica la presencia de los planos (111) y (102). (d) Imágenes de HRTEM y sus respectivos FFT de las zonas encerradas por cuadrados rojos en (c).

Por lo que, bajo las condiciones experimentales de estas síntesis ($\text{pH}=7$ u 8 y TA), los iones de Au muy probablemente formen complejos del tipo $\text{AuCl}_2(\text{OH})_2^-$ y $\text{AuCl}(\text{OH})_3^-$, que ya han sido reportados [15] y que tienen un potencial de reducción más bajo, de alrededor de 0.62 V , que hace más lenta su reducción en comparación a la de los iones de Ag. Además,

en la solución de Ag, se podría estar formando AgO (que tiene un potencial de reducción más alto: 1.4 V) lo que acrecentaría más fácilmente su reducción frente a la de los iones de Au [14]. En el caso del zinc, se podría esperar que la reducción de los iones no sucediera, ya que, el Zn^{2+} tiene un potencial de reducción estándar (-0.76V) [11-14] más bajo inclusive que el de la glucosa; lo que nos dice que probablemente en la solución se estén formando complejos del tipo ZnOH^+ (ya que si no fuera de esta forma, simplemente no podría ser reducido por la glucosa), que tienen un potencial de reducción estándar casi igual al de la glucosa (-0.43 V), y así la reducción de iones de Zn podría ser llevada a cabo [14, 16].

La diferencia considerable entre los tamaños de las NPs de Zn y los de las NPs-Au y Ag, está asociada con el bajo poder de reducción que tiene la glucosa frente a los iones de Zn, ya que al tener el ZnOH^+ un potencial de reducción (-0.4) casi igual al de la glucosa (-.43 V), la reducción de los iones es menos vigorosa y se obtiene así una menor cantidad de iones reducidos, lo que llevaría a nucleaciones lentas y pequeñas de átomos de Zn que formarían NPs más pequeñas. También, al existir menor cantidad de iones reducidos, existe menor cantidad de NPs-Zn, lo cual es reflejado en la baja intensidad de las bandas asociadas a la RPS en los espectros de absorción.

La estabilización de nanopartículas metálicas realizada usando solamente moléculas de DG no ha sido reportada. A pesar de que las moléculas de DG son muy pequeñas, comparadas con las de otros surfactantes (PVP, polisacáridos, ADN, etc), y de que son, además, moléculas neutras (por lo que no tendrían los efectos de un surfactante iónico eficaz como el citrato de sodio o el etilenglicol), éstas surfactan por sí solas a las NPs-M hasta por más de 1 año (de acuerdo a lo que hemos observado en nuestro trabajo). Existen trabajos previos

[8-10] en donde reportan que diferentes polisacáridos (con unidades de DG) surfactan NPs metálicas por medio de interacciones electrostáticas entre sus grupos OH y la superficie positiva de las NPs-M. Así, además de evitar la aglomeración de las NPs, se obtienen sistemas coloidales estabilizados gracias a la interacción estérica entre polisacáridos (como lo mencionamos en la sección 3.2.1). Algo semejante es lo que llega a ocurrir en nuestras soluciones coloidales: los grupos OH de las moléculas de DG o de AcDGo se enlazan por medio de interacción electrostática a la superficie positiva de las NPs y detienen así su crecimiento; pero estas moléculas son muy pequeñas y neutras, por lo que no podrían evitar la aglomeración de las NPs. Creemos, entonces, que la característica peculiar que hace que la DG, o el AcDGo (Fig.3.18(a)), sea un buen estabilizador, es que estas moléculas forman puentes de hidrógeno entre ellas, creando así cadenas de dos o más unidades de DG e, inclusive, llegan a formar cúmulos (Fig. 3.18(b)). Esto podría ser posible pues se ha reportado que, a través de enlaces de puentes de hidrogeno, las moléculas de DG en solución acuosa forman cadenas y cúmulos y que esto dependerá fuertemente de la concentración de DG y del pH de la solución [17, 18]. Debido a la estabilidad que presentan las NPs sintetizadas para pH=7, podemos decir que las cadenas y/o los cúmulos de DG se enlazan en la superficie de la NP, adoptando así una característica polimérica, por lo que evitarán, por medio de interacciones estéricas, la aglomeración de NPs (Fig. 3.18(c)).

La síntesis de NPs-M, utilizando DG en un medio ácido, fue también realizada; pero al bajar de un cierto valor de pH (pH=5, medio ácido) la reducción de los iones metálicos simplemente ya no ocurría. Para un medio menos ácido (pH alrededor de 6), la reducción sucedía, pero la aglomeración de NPs ocurría rápidamente.

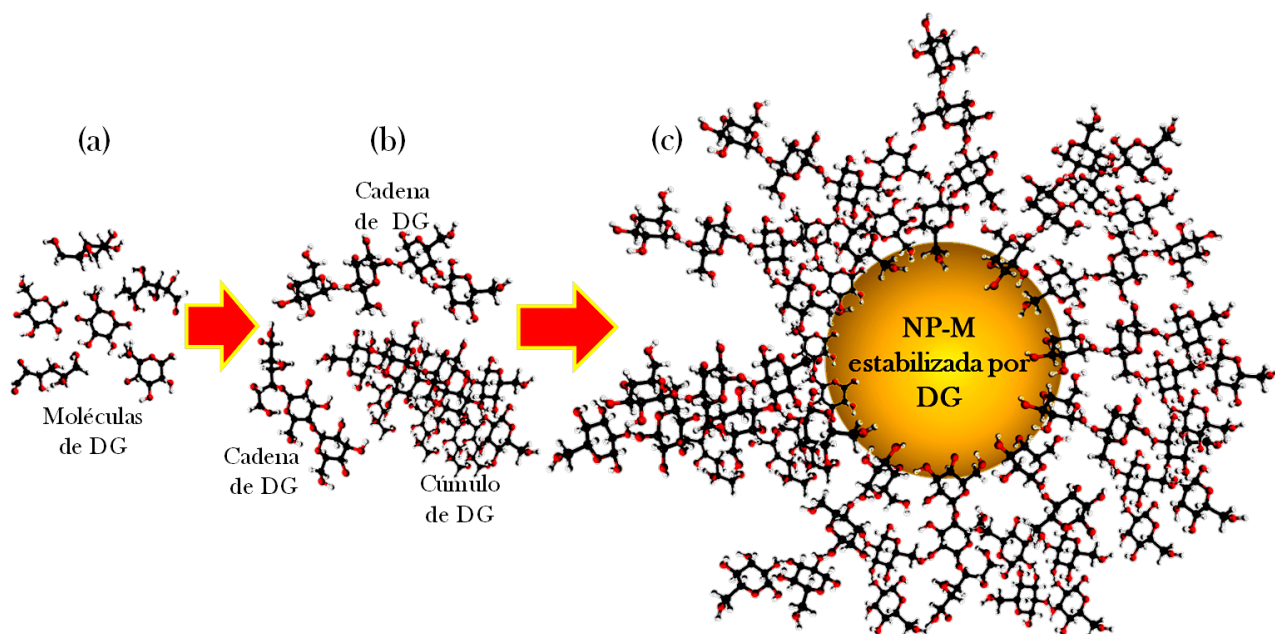


Figura 3.18. Esquema de la estabilización de las NPs-M por moléculas de DG y AcDGo: (a) moléculas de DG, (b) moléculas de DG enlazadas por puentes de hidrógeno, formando cadenas y cúmulos, y (c) NP-M estabilizada por moléculas, cadenas y cúmulos de DG.

simplemente ya no ocurría. Para un medio menos ácido (pH alrededor de 6), la reducción sucedía, pero la aglomeración de NPs ocurría rápidamente.

Después de la biosíntesis de las NPs-M, se realizaron algunas pruebas con las soluciones coloidales para ver si el medio usado (solución coloidal con EP o DG) era favorable para el crecimiento de los hongos, es decir, para estudiar la relación entre el nutriente y el crecimiento de las bioplantillas (hongos). Los resultados se presentan en el capítulo siguiente.

Bibliografía 3

- [1] S. K. Ghosh y T. Pal. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical Reviews* **107**, 4797-4862, 2007.
- [2] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed y M. A. El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 7238-7248, 2006.
- [3] J. J. Mock, D. R. Smith y S. Schultz. Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nano-particles. *Nano Letters* **3**, 485-491, 2003.
- [4] W. E. Benet, G. S. Lewis, L. Z. Yang y D. E. P. Hughes. The mechanism of the reaction of the Tollens reagent. *Journal of Chemical Research* **35**, 675-677, 2011.
- [5] N. Kardos y J. L. Luche. Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Research* **332**, 115-131, 2001.
- [6] X. Liu, L. Yu, F. Xie, M. Li, L. Chen y X. Li. Kinetics and mechanism of thermal decomposition of cornstarches with different amylose/amylopectin ratios. *Starch/Stärke* **62**, 139-146, 2010.
- [7] L. Kupiainen. *Dilute acid catalyzed hydrolysis of cellulose-extension to formic acid*. Dissertation, University of Oulu, 2012.

- [8] L. Liu, G. Qin, P. Raveendran y Y. Ikushima. Facile “green” synthesis, characterization, and catalytic function of β -D-Glucose-stabilized Au nanocrystals. *Chemistry-A European Journal* **12**, 2131-2138, 2006.
- [9] Y. Sui, Y. Cui, Y. Nie, G. M. Xia, G. X. Sun y J. T. Han. Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase. *Colloids and Surfaces B* **93**, 24-28, 2012.
- [10] S. T. Hussain, M. Iqbal y M. Mazhar. Size control synthesis of starch capped-gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 1383–1391, 2009.
- [11] G. Milazzo, S. Caroli y V. K. Sharma. *Tables of standard electrode potentials*. Wiley, Chichester, 1978.
- [12] A. J. Bard, R. Parsons y J. Jordan. *Standard potentials in aqueous solutions*. Marcel Dekker, Nueva York, 1985.
- [13] S. G. Bratsch. Standard redox potential table. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **18**, 1-21, 1989.
- [14] D. C. Harris. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté, S.A., Barcelona, España, 2007.
- [15] D. V. Goia y E. Matijevic, Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **146**, 139–152, 1999.
- [16] W. Stumm y J. J. Morgan. *Aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1970.

- [17] C. Chen, W. Z. Li, Y. C. Song, L. D. Weng y N. Zhang. Hydrogen bonding analysis of hydroxyl groups in glucose aqueous solutions by a molecular dynamics simulation study. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **33**, 7, 2012.
- [18] C. Chen, W. Z. Li, Y. C. Song, L. D. Weng y N. Zhang. Formation of water and glucose clusters by hydrogen bonds in glucose aqueous solutions. *Computational and Theoretical Chemistry* **984**, 85-92, 2012.

Capítulo 4

Fabricación de estructuras 1D metálicas y su utilización como sustratos SERS

En la actualidad ha aumentado el interés en el autoensamble de NPs-M debido a que los arreglos que resultan incrementan, modifican o crean ciertas propiedades de las NPs-M. Un ejemplo importante es la modificación de la RPS que abre la vía hacia diversas y prometedoras aplicaciones. Una de estas aplicaciones, que sin duda ha generado gran expectativa, es el uso de los arreglos obtenidos por autoensamble de NPs-M como sustratos en la espectroscopía Raman amplificada por superficies o SERS (por las siglas de su nombre en inglés: *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*), la cual ha llegado a ser la técnica más eficiente para detectar moléculas orgánicas y biológicas en mínimas concentraciones. Esta aplicación es posible gracias a que en los arreglos de NPs-M ensambladas aparecen “*hotspots*” responsables de aumentar el campo eléctrico local y este, a su vez, amplifica la respuesta Raman normal de las moléculas cercanas al arreglo de NPs.

Hace unos cuantos años surgieron métodos de ensamble amigables con el medio ambiente y con los seres vivos para los que se reportan resultados sumamente prometedores, debido a

los diversos arreglos, extraordinarios y únicos; obtenidos, a lo barato de los procesos; al uso de reactivos de origen biológico que, por tanto, no son tóxicos, etc. Pero estos métodos de ensamble no sólo aportan estas bondades, sino que también nos dan la posibilidad de analizar las interacciones entre materiales inorgánicos y sistemas biológicos. El uso en aplicaciones SERS de los arreglos obtenidos por métodos biológicos o métodos verdes es realmente contado, pero se ha mostrado, como se demuestra también en este trabajo, que pueden ser explotados como sustratos SERS con mejores resultados que la mayoría de los sustratos SERS obtenidos por otros métodos y reportados en la literatura. En este capítulo se verá el mecanismo de autoensamble de NPs-M en las bioplantillas, la fabricación de microestructuras metálicas y su utilización como sustratos SERS de alto factor de aumento.

4.1. Soluciones de nutrientes y bioplantillas

Antes de inocular las esporas de los hongos *Trychoderma asperellum* (*Tas*) y *Aspergillus sydowii* (*Asy*) en las soluciones coloidales de NPs metálicas, se realizaron inoculaciones en soluciones acuosas preparadas solamente con nutrientes y ADI. Unas fueron soluciones de D-glucosa (DG) y otras, de extracto de papa (EP). El propósito era analizar el crecimiento de los hongos (las bioplantillas) en función de la cantidad de cada nutriente. Las gráficas de la figura 4.1 muestran el tiempo que tardó el micelio de los hongos *Tas* y *Asy* en crecer aproximadamente 50 mm en función de la cantidad de nutriente (DG o EP) de las soluciones. En general, observamos que *Tas* crece más rápido que *Asy* en cualquiera de las soluciones, siendo la solución de EP en donde más rápido crecen ambas especies. Las diferencias entre los tiempos de crecimiento de las dos especies de hongo son más pequeñas para el crecimiento en las soluciones de EP. Estos resultados son debidos a que la solución de EP es más rica en nutrientes y, además, a que la mayoría de los hongos (en este caso, las

dos especies utilizadas) degradan fácilmente el almidón, pues es muy frecuente que en su artillería enzimática cuenten con enzimas α -amilasa que degradan y transportan las moléculas del almidón. Por el contrario, no muchos hongos producen la enzima glucosidasa (transportadora de glucosa), aunque se ha reportado que algunos hongos tienen la capacidad de producirla en un medio rico en DG [1,2]. Como era de esperarse, la proliferación del micelio aumenta con la cantidad de nutrientes, DG o EP, contenidos en las soluciones.

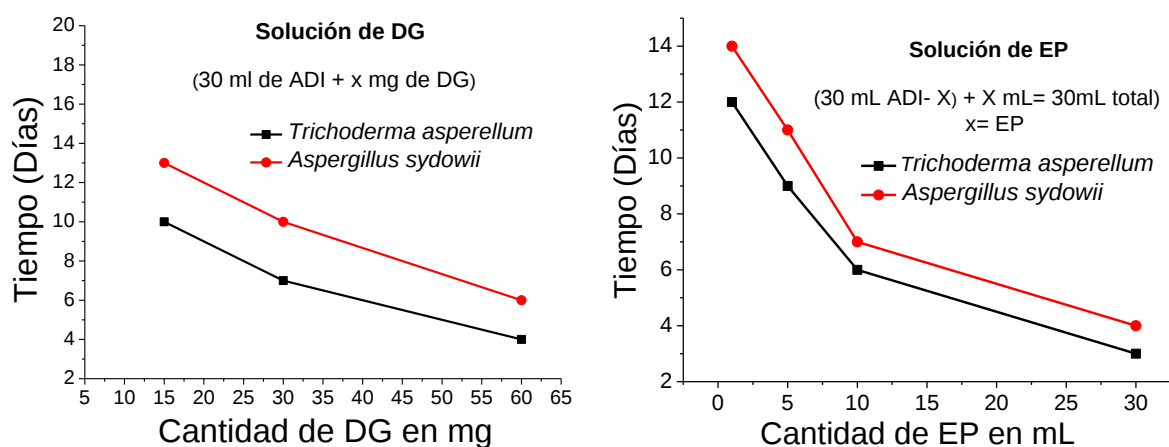


Figura 4.1. Gráficas que muestran el número de días que tarda el micelio de los hongos en crecer aproximadamente 50 mm en función de la cantidad de (a) DG y (b) EP.

Una vez que se determinó que los hongos si crecían en estos medios, se procedió a la inoculación de las esporas en las soluciones coloidales de NPs-M, que habían sido sintetizadas usando tanto DG como EP, para determinar si los hongos podrían crecer también en estos medios.

4.2. Fabricación de estructuras 1D híbridas (hongo/NPs-M)

4.2.1. Inoculación de esporas de los hongos en las soluciones coloidales

Las esporas de los hongos fueron inoculadas en las soluciones coloidales de NPs-M sintetizadas usando EP o DG (ver sección 3.1) como reductor-estabilizador. En la figura 4.2 se muestra un esquema de la inoculación de las esporas (tomadas de la colonia del hongo,

imagen del extremo izquierdo) en una solución coloidal de Au (ver Apéndice A). Al paso del tiempo las esporas germinan y ocurre el crecimiento del hongo, lo que muestra que el medio es propicio para ello. Después de un cierto tiempo (alrededor de 7 días), los hongos se ven de color negro y la solución es transparente; esto nos indica la posible adherencia o introducción de las NPs de oro en las hifas del hongo (Fig. 4.2). Se realizó el mismo procedimiento para las soluciones coloidales de NPs-Ag y NPs-Zn.

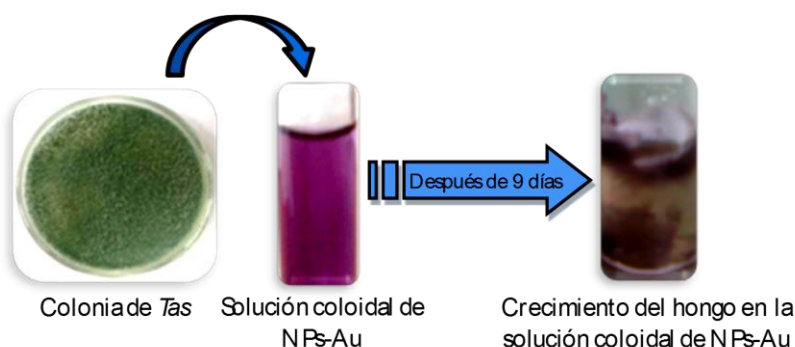


Figura 4.2. Esquema de la inoculación de las esporas del hongo en una solución coloidal de NPs-Au. Después de aproximadamente 9 días de la inoculación, se apreció que el hongo había crecido en la solución coloidal, volviendo transparente la solución coloidal.

4.2.2. Fabricación de las estructuras híbridas: hongo/NPs-Au.

Después del proceso de inoculación de esporas en las soluciones coloidales, se realizaron diversas pruebas y análisis con el propósito, primero, de observar el crecimiento del hongo en estas soluciones y, segundo, para obtener las estructuras híbridas. Las soluciones coloidales de NPs-Au sintetizadas con EP o DG, con valores de pH entre 4-8, fueron analizadas. Después de observar el crecimiento del hongo en las soluciones coloidales, una parte del micelio crecido fue retirado para su observación en el microscopio óptico. En las figuras 4.3 y 4.4 se observan micrografías ópticas representativas de los hongos crecidos en las soluciones coloidales de NPs-Au con EP y DG, respectivamente. Los resultados obtenidos, que más adelante explicaremos, nos ayudaron a concluir que las soluciones

coloidales de NPs-Au sintetizadas con DG y EP con valores de pH iguales a 8 o 7 son las soluciones coloidales óptimas para la fabricación de las estructuras híbridas (hongo/NPs-M). En este sentido, se encontró que:

- En las soluciones coloidales preparadas con EP y con valores de pH < 7 se llega a dar el crecimiento de las bioplantillas, aunque no ocurre la incorporación de las NPs-Au en sus hifas, dado que se observan hifas transparentes y una gran cantidad de NPs-Au aglomeradas fuera de estas, como se puede apreciar en las imágenes de la figura 4.3 (a, b y c). Ya habíamos comentado que para estos valores del pH la estabilidad de las NPs no es muy buena. Después de esto, se inocularon esporas en soluciones coloidales de pH ajustado a 8 o 7 (también algunas con valores de 7.4 o 7.6), en donde de igual forma se da el crecimiento de la bioplantilla, con la diferencia que las hifas lucen como si estuvieran pintadas, oscuras o tuvieran ambas características a la vez (Fig. 4.3 (d, e y f)). Esto es debido a la posible incorporación de las NPs-Au en la hifa. Los hongos mostrados fueron crecidos en soluciones de muestras 1EP preparadas en la forma mencionada en la sección 3.1.1.
- En el caso de las soluciones coloidales preparadas con DG, como ya se había mencionado en la sección 3.1.2, la formación de las NPs-Au no ocurre para valores de pH < 5. Por eso, las esporas de los hongos *Tas* y *Asy* fueron inoculadas en soluciones coloidales de pH superior a 5. En soluciones de pH comprendido entre 5 y 7, aunque sí ocurre la formación de NPs, es evidente su aglomeración en la solución y que no se incorporan a las hifas (Fig. 4.3(a)). Por lo tanto, se prepararon soluciones de pH igual a 7 u 8 (la preparación fue la misma que se describió en la sección 3.2.2) en las que, además de que resultaron ser soluciones estables (hasta

por dos años, sección 3.1.2), se observó la incorporación de las NPs-Au en las hifas (Fig. 4.3 (a, b y c)).

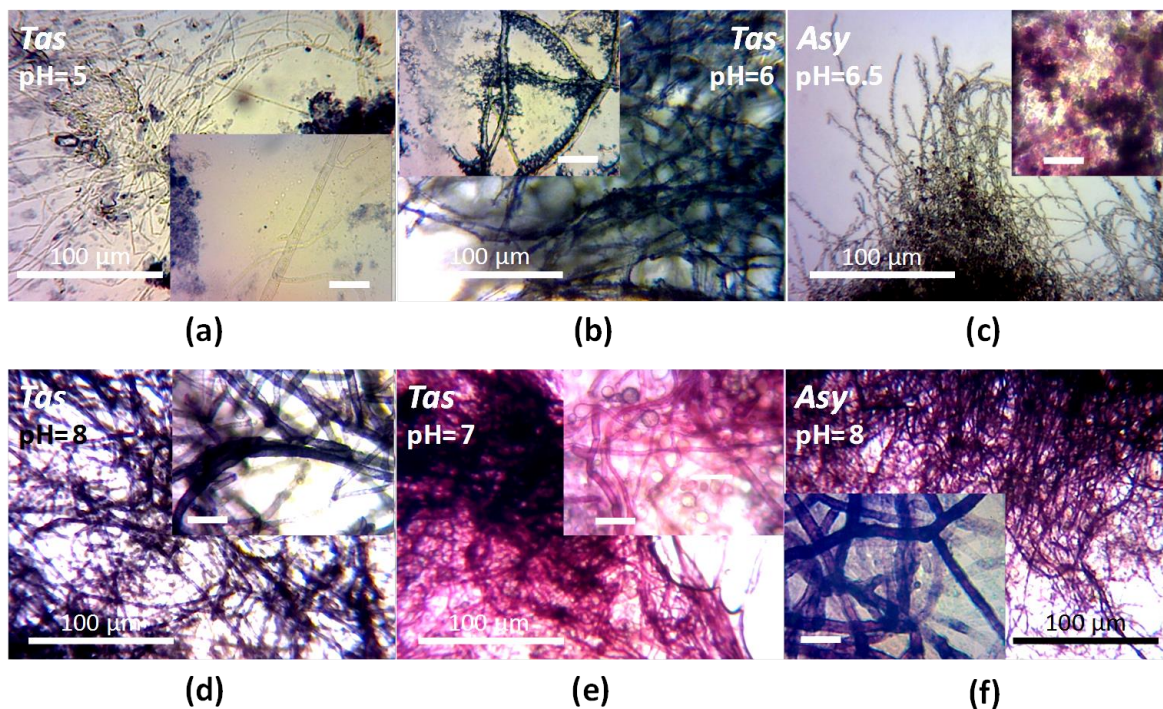


Figura 4.3. Imágenes de microscopía óptica de las hifas de *Tas* y *Asy* crecidas en soluciones coloidales de NPs-Au utilizando EP (muestras coloidales del tipo 1EP) con valores de pH menores de 7 (a, b y c) e iguales a 8 o 7 (d, e, f). Las imágenes insertadas son una ampliación de una zona del mismo micelio de la misma muestra (las barras no marcadas son de escala de 10 µm).

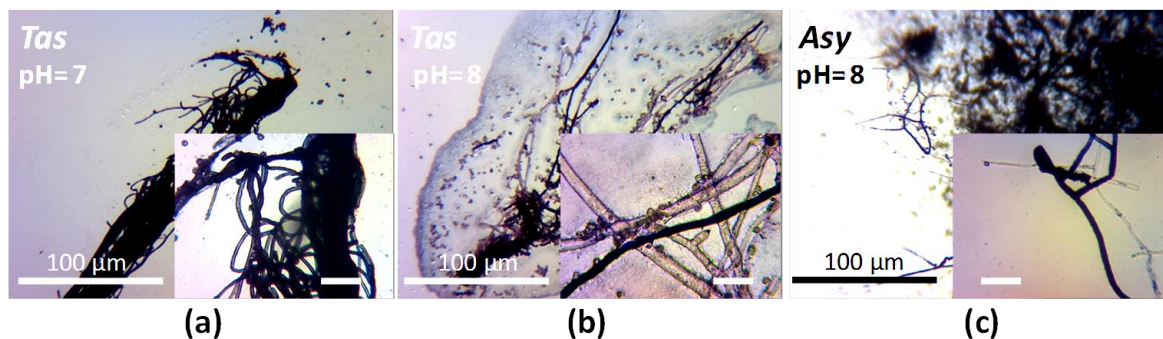


Figura 4.4. Imágenes de las hifas de *Tas* y *Asy* crecidas en soluciones coloidales de NPs-Au previamente sintetizadas con DG, con valores de pH de (a) 8, (b) 7 y (c) 8. Las imágenes insertadas son las imágenes ampliadas de algunas zonas del micelio de la misma muestra (la barra blanca hace referencia a la escala de 10 µm).

4.2.3. Fabricación de las estructuras híbridas: hongo/NPs-Ag y hongo/NPs-Zn.

Los procedimientos utilizados para la obtención de las estructuras híbridas hongo/NPs-Au fueron repetidos para la obtención de las estructuras híbridas de Ag y Zn. Se inocularon esporas de los hongos en soluciones coloidales de NPs-Ag o NPs-Zn sintetizadas con EP o DG y se obtuvieron resultados similares a los del caso de las NPs-Au; específicamente, que las soluciones con valor de pH igual a 8 o 7 también son las mejores para la obtención de estructuras híbridas de Ag y Zn. Las soluciones coloidales de NPs-Ag y NPs-Zn fueron sintetizadas utilizando el procedimiento discutido en la sección 3.2.4. En las figuras 4.5 y 4.6 se muestran imágenes de microscopía óptica de hifas de las bioplantillas crecidas en soluciones coloidales de NPs-Ag y NPs-Zn, respectivamente.

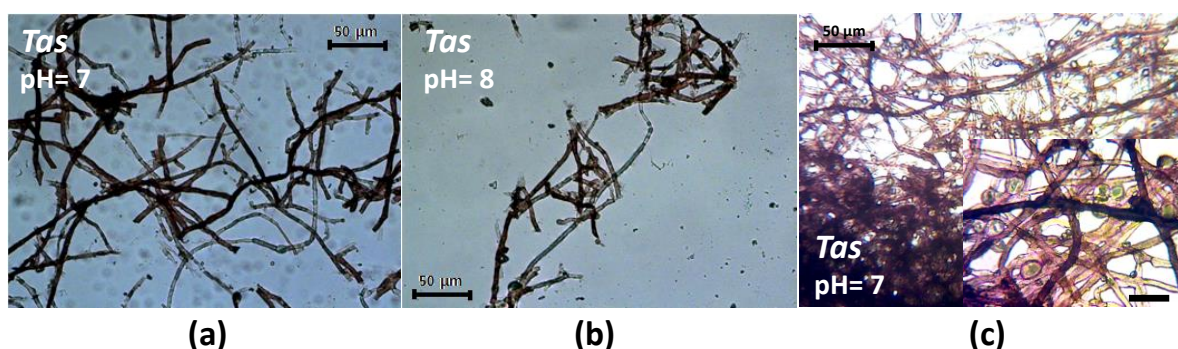


Figura 4.5. Imágenes de microscopía óptica de las hifas de *Tas* crecidas en soluciones coloidales de NPs-Ag previamente sintetizadas con DG, con valores de pH de (a) 7, (b) 8 y (c) 7. La imagen insertada en (c) es una ampliación de una zona del micelio de la misma muestra (la barra negra hace referencia a la escala de 10 µm).

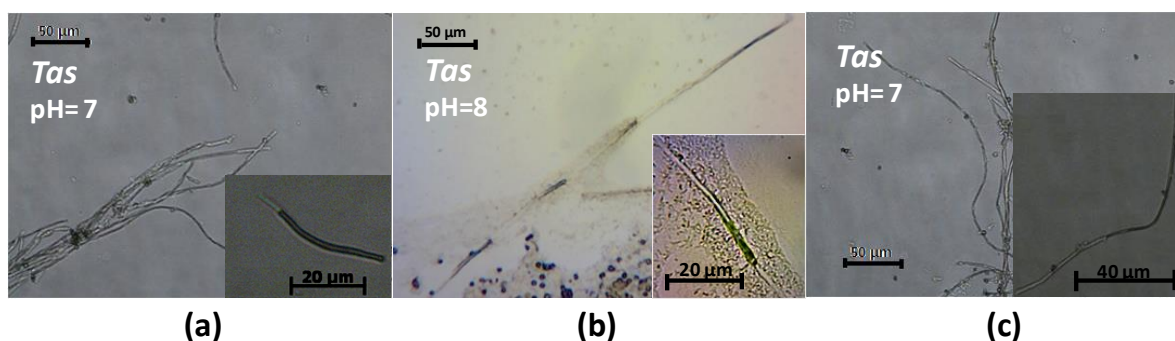


Figura 4.6. Imágenes de microscopía óptica de las hifas de *Tas* y *Asy* crecidas en soluciones coloidales de NPs-Zn previamente sintetizadas con DG y EP, con valores de pH

de (a) 7 (DG), (b) 8 (EP) y (c) 7 (DG). Las imágenes insertadas son una ampliación de una zona del micelio de la misma muestra.

En la figura 4.7, se muestran las gráficas asociadas al tiempo que tardó el micelio en crecer aproximadamente 30 mm con relación al tipo de metal de las soluciones coloidales. En estas se observa que el crecimiento de *Tas* y *Asy* es más rápido en la solución de Au, seguido por el crecimiento en la de Ag. Los medios coloidales de Ag y Zn mostraron que no son óptimos para el crecimiento de las bioplantillas, ya que en variadas ocasiones el hongo no creció (lo que se ha señalado mediante los cuadrados y círculos segmentados en la gráfica de la Fig. 4.7). Aún más, la solución de Zn inhibía casi por completo el crecimiento del hongo (en el caso del hongo *Asy*, ya que *Tas* llegaba a crecer después de un mes pero la cantidad de micelio era muy pequeña). Por lo que, solo en el caso de la solución coloidal de Zn, se varió la concentración de precursor metálico usado durante las síntesis tanto con EP y DG (sección 3.1.1 y 3.1.2) desde 5 mM hasta 1 mM, consiguiendo con este último valor el crecimiento del hongo. El tiempo de crecimiento de la bioplantilla en esta nueva solución es parecido al tiempo de crecimiento del hongo en las soluciones coloidales de NPs-Ag.

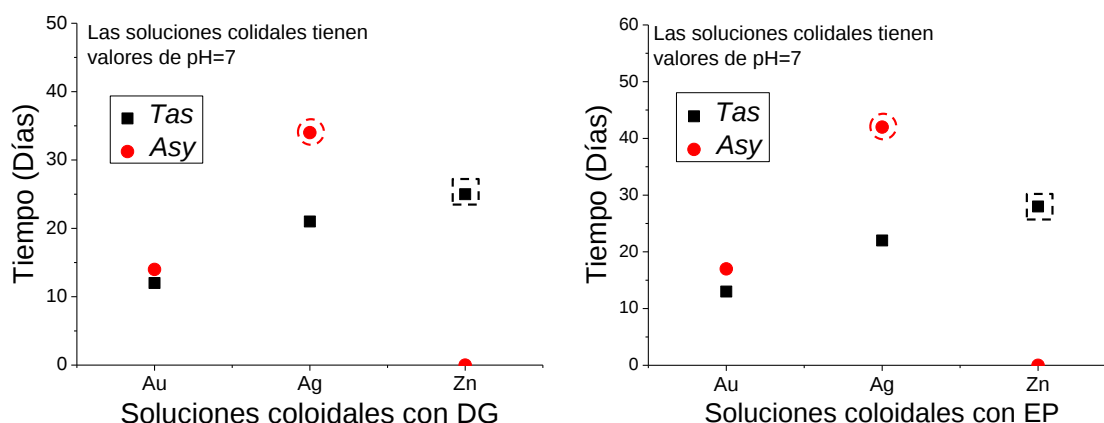


Figura 4.7. Gráficas que muestran el tiempo de crecimiento de aproximadamente 30 mm de micelio con relación a la naturaleza de la solución coloidal. Los círculos y cuadrado segmentados que aparecen en ambas gráficas indican que en ocasiones el crecimiento del hongo no se llegaba a dar.

4.2.4. Resultados para las estructuras híbridas y discusión

Como mencionamos en la sección 4.2.2, una parte del micelio crecido en la solución coloidal fue extraído y colocado en un portaobjetos para observarlo directamente en un microscopio óptico (MO) de campo claro y fuente de luz situada en la base del microscopio, es decir, abajo del portaobjetos. Por ello, una parte de la luz se absorberá, otra se reflejará y otra se transmitirá. La luz transmitida es la que llega a la lente objetivo y formará la imagen. Las hifas o algunas regiones de éstas lucen oscuras debido a la presencia de NPs-M que no dejan pasar la luz. Es decir, si existe una cantidad muy grande de NPs en las hifas, estas se verán completamente negras (Fig. 4.8(a y b)). Si hay menor cantidad de NPs-Au, las hifas se verán oscuras pero dejarán pasar la luz parcialmente (Fig. 4.8(c)).

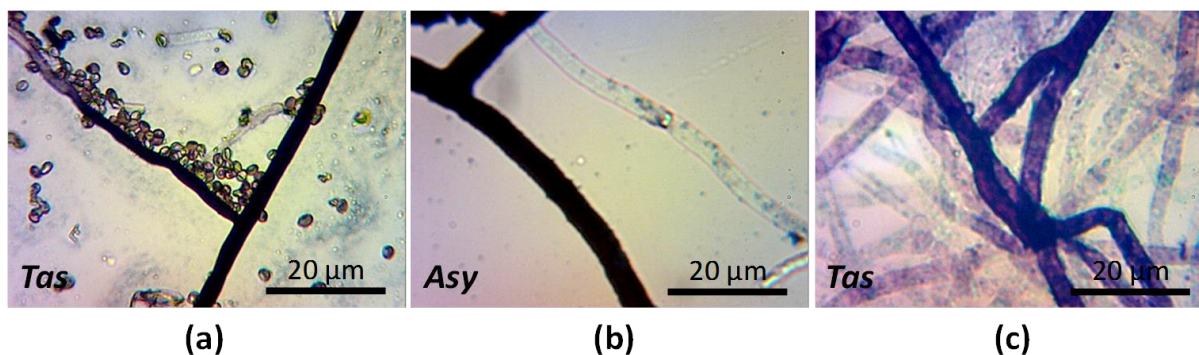


Figura 4.8. Imágenes de microscopía óptica de: (a) una hifa ramificada de *Tas* que se observa completamente negra en casi toda su extensión, excepto en la parte superior izquierda, que se ve menos oscura, lo que indica menor presencia de NPs-Au; (b) una hifa de *Asy* completamente negra por la presencia de una gran cantidad de NPs-Au en ella y, a su lado, en contraste, una hifa con unas cuantas NPs-Au (pequeñas manchas negras); y (c) hifas de *Tas* donde se observan diferentes tonalidades, desde muy oscuras hasta muy claras, que muestran la variación de las cantidades de NPs-Au incorporadas a ellas.

Los resultados obtenidos, referentes a la obtención de estructuras híbridas, nos señalan que las soluciones coloidales de NPs-M preparadas con EP o DG, con valor de pH entre 7 y 8, son las soluciones óptimas para el crecimiento de las bioplantillas. Por eso decidimos trabajar solo con soluciones coloidales de pH = 7 y 8. El crecimiento pobre en las

soluciones coloidales ácidas se debe a que en estas existe un mayor número de protones H^+ que “atacan” a los grupos OH de las moléculas surfactantes de las NPs-M. Esto provocará que disminuya la interacción entre los grupos OH de las moléculas surfactantes y los grupos OH de los constituyentes de la pared celular. Como explicaremos más adelante, la presencia expuesta de estos dos grupos es necesaria para que las NPs sean adsorbidas en la pared celular de la hifa.

A pesar de que, como se vio en el Capítulo 3, las NPs más estables se hallan en las soluciones coloidales de $pH > 7$, aun así se analizó la fabricación de las estructuras híbridas en soluciones ácidas, pues es sabido que un medio óptimo para el crecimiento de los hongos filamentosos es uno ligeramente ácido ($pH = 5, 6$; sección 2.5.1); aunque esto no significa que el hongo no crezca en soluciones básicas, ya que esto depende fuertemente de las características del hongo [1,2]. Como vimos, el crecimiento de *Asy* llega a ser, en general, más lento que el de *Tas* en las soluciones coloidales tanto con EP como con DG y, en ocasiones, su crecimiento era muy limitado o no crecía. Debido a los resultados variables que se obtuvieron en relación al crecimiento de *Asy* en las diferentes soluciones examinadas, se optó por trabajar más con el hongo *Tas*, ya que, toda vez que las esporas de este último fueron inoculadas en soluciones ácidas, alcalinas o neutras, el hongo siempre creció. Esto es una confirmación de las características naturales ya reportadas para *Tas*, tal como su alta velocidad de crecimiento, la abundante esporulación y la capacidad de crecimiento sobre una amplia gama de sustratos, todo debido a la gran capacidad enzimática que posee, que lo hace ser uno de los hongos más utilizados en el control biológico de patógenos fúngicos y en la producción de enzimas a nivel industrial [3-5].

De los resultados obtenidos en relación al crecimiento de las bioplantillas de *Tas* y a las características de las estructuras híbridas, se pueden señalar diferencias entre lo que se obtuvo en las soluciones coloidales de NPs-Au, Ag y Zn. En la figura 4.9 se muestran 3 imágenes ópticas típicas de las estructuras híbridas obtenidas en las soluciones de NPs-Au, Ag y Zn. También se han insertado los histogramas de distribución de diámetros de las estructuras correspondientes. En la tabla 4.1, se destacan las características encontradas. Los puntos 1-3 de la tabla están relacionados con la naturaleza propia de las soluciones coloidales, específicamente con la cantidad de iones metálicos. Es conocida la acción antimicrobiana de los iones de Ag, especialmente su acción antifúngico [6-9], pero la presencia de estos iones en nuestras soluciones es mínima, tal que puede permitir de alguna forma el crecimiento del hongo. En el caso de los iones de Zn, que si bien forman parte de los nutrientes trazas de los hongos, su abundancia en un medio llega a ser nociva y puede inhibir el crecimiento del hongo [1,2]. En los espectros de absorbancia de la solución coloidal de Zn (Fig. 3.14), se observa un pico asociado a la RPS de las NPs-Zn poco intenso (323 nm) en comparación con el pico asociado a los iones de Zn (272 nm, ver Apéndice B). Por tanto, es por la abundancia de los iones de Zn que esta solución limita el crecimiento de los hongos (por eso se hizo disminuir la concentración de iones de Zn para obtener el crecimiento del hongo, aunque la cantidad de micelio y su crecimiento fueron menores que en las soluciones de Au y Ag). Los puntos 4 a 6 de la tabla 4.1 están relacionados con el tamaño de las NPs-M, el cual se manifiesta directamente en el mecanismo de incorporación de las NPs en las hifas de las bioplantillas, tal como se explicará más adelante.

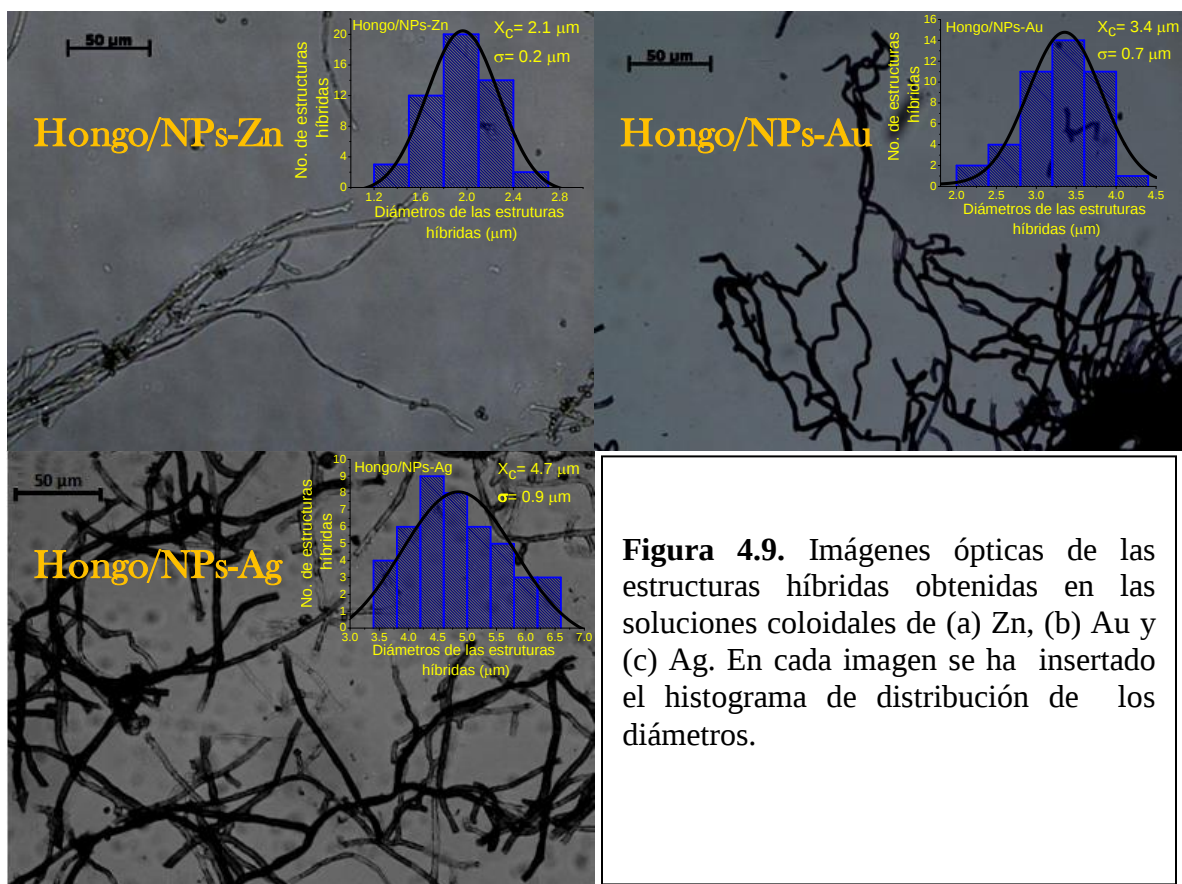


Figura 4.9. Imágenes ópticas de las estructuras híbridas obtenidas en las soluciones coloidales de (a) Zn, (b) Au y (c) Ag. En cada imagen se ha insertado el histograma de distribución de los diámetros.

Tabla 4.1. Características generales de las estructuras híbridas (*Tas*/NPs-M) obtenidas en soluciones coloidales de NPs de los tres metales.

	Solución Coloidal de Au	Solución Coloidal de Ag	Solución Coloidal de Zn
Trichoderma asperellum	1. Medio “adecuado” para el crecimiento de la bioplantilla.	Medio menos adecuado que la solución de Au y menos toxico que la solución de Zn.	Medio tóxico para el hongo.
	2. El crecimiento de la bioplantilla es más rápido.	El crecimiento de la bioplantilla es lento.	El crecimiento de la bioplantilla es mucho más lento.*
	3. La cantidad de micelio obtenida es alta.	La cantidad de micelio es mayor que en el caso del Zn y menor que en Au.	La cantidad de micelio obtenida es baja.
	4. El diámetro de las estructuras híbridas	El diámetro de las estructuras híbridas	El diámetro de las estructuras

	está alrededor de 3.7 μ m	está alrededor de 4.4 μ m	híbridas alrededor de 2.1 μ m	está de
	5. La forma de la hifa es alterada, ya que a veces se observa torcida y doblada.	La forma de la hifa es alterada, ya que a veces se observa torcida y doblada (menos que en Au).	La forma natural de la hifa pareciera no ser alterada.	
	6. Las NPs-Au están mayormente localizadas en la pared celular y en la superficie de la hifa.	Las NPs-Au están mayormente localizadas en la pared celular y en la superficie de la hifa.	Las NPs-Zn están mayormente localizadas en el centro de la hifa.	

4.3. Fabricación de estructuras metálicas 1D de Au

4.3.1. Extracción de las bioplantillas (hongos)

Después de obtener las estructuras híbridas, el siguiente paso consistió en separar las hifas que forman el micelio, debido a que estas crecen de forma desordenada, enredándose entre ellas. Además de esto, se requirió separar las estructuras híbridas de las hifas simples y de limpiar la solución de esporas y de NPs-M aglomeradas. Este proceso consistió básicamente en pasos de centrifugación y sonicación (Apéndice C), quedando las estructuras híbridas suspendidas en ADI. Después, para el caso de las estructuras híbridas de Au, se tomaron de 3 a 5 gotas de esta solución y se dispersaron sobre sustratos de Si para someterlas a tratamiento térmico (TT) en un medio de argón y oxígeno, para calcinar así el material orgánico (bioplantilla) y obtener las estructuras metálicas 1D (ver el apéndice D). Después del TT, se podían apreciar a simple vista unos diminutos puntos brillantes de color amarillo-naranja, que nos indicaban la posible presencia de microestructuras de Au sobre los sustratos de Si. Las muestras de Au tratadas térmicamente fueron analizadas con SEM

para conocer, entre otras cosas, la morfología, el tamaño y la topografía de las estructuras metálicas obtenidas.

En la figura 4.10(a-g) se muestran imágenes de SEM representativas de las microestructuras de Au obtenidas después del TT. Podemos observar microestructuras 1D de formar tubular, en su mayoría, pues también se obtuvieron estructuras planas. En ambos casos, la superficie de las estructuras es rugosa y porosa. El diámetro promedio de las estructuras metálicas es de alrededor de 3.9 μm , como se muestra en el histograma de distribución de diámetros (Fig. 4.10(h)). Las estructuras tubulares obtenidas tienen una longitud promedio de decenas de micrómetros y el espesor promedio de las paredes es de 180 nm.

4.3.2. Resultados y discusión

Sin duda, el ensamble de las NPs-Au en la bioplantilla, que nos ha llevado a la obtención de estructuras híbridas y, de estas, a la fabricación de estructuras metálicas 1D de características y propiedades únicas (que más adelante comentaremos), es la clave del éxito en este proceso. Nos damos, por eso, a la tarea de explicar el mecanismo de ensamble de las NPs-M en la bioplantilla.

Como se comentó en la sección 2.1, la hifa de un hongo está rodeada por una pared celular (PCe) constituida por diversos compuestos, que se encuentra en contacto directo con el medio que la rodea (Fig. 4.11(a)). Debajo de ella, hacia el material citoplasmático, se encuentra ubicada la membrana plasmática (MP), la cual cubre el material citoplasmático (Fig. 4.11(a)). En la literatura se reporta que el espesor de la PCe de los hongos va de 100 a 250 nm [1, 10-12].

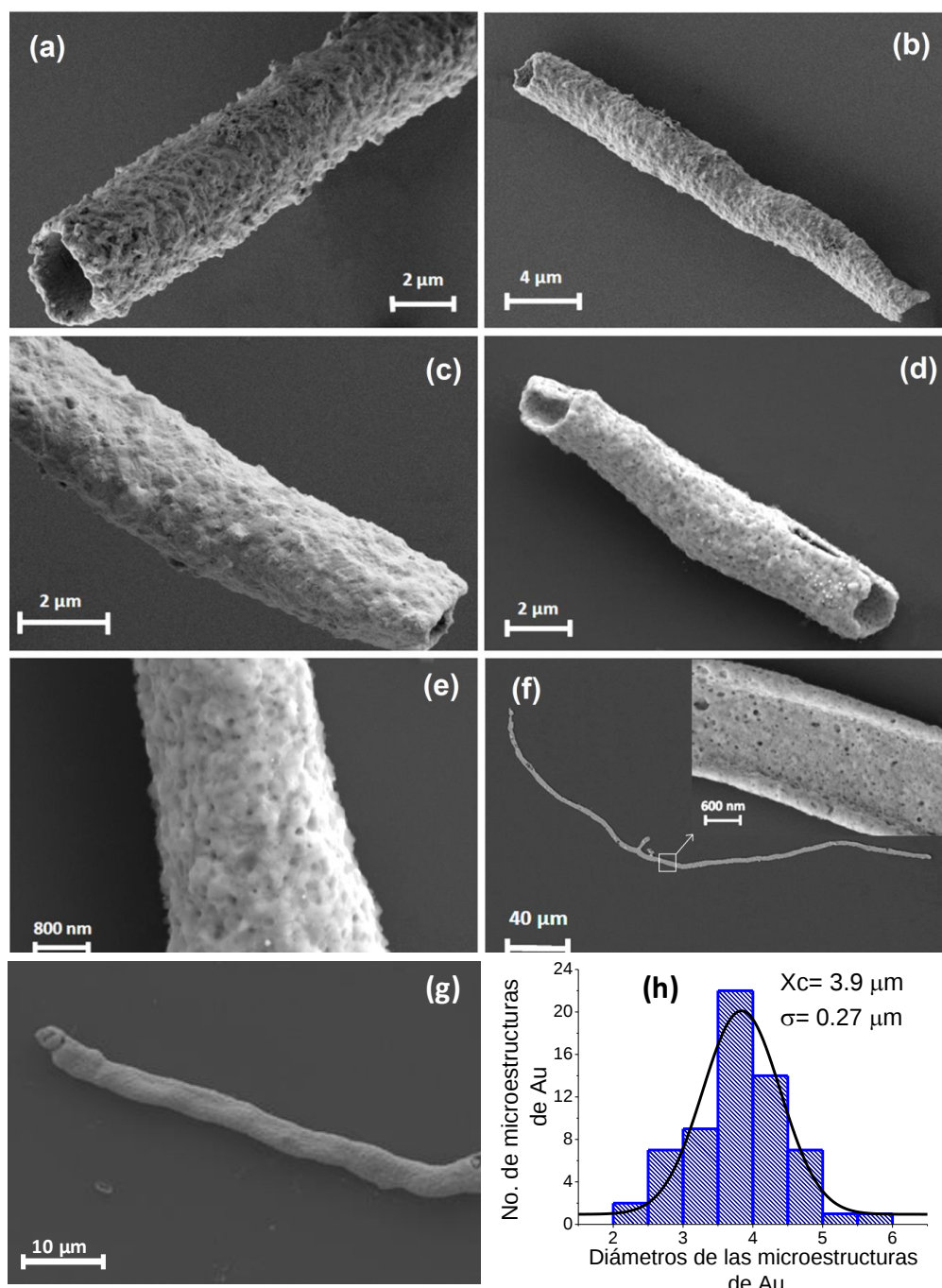


Figura 4.10. Imágenes SEM representativas de las estructuras metálicas de Au obtenidas después de calinar las estructuras híbridas. Las formas de las microestructuras fueron principalmente tubulares y planas. La imagen (h) muestra el histograma de distribución de los diámetros de las microestructuras de Au; se puede ver que estos son de alrededor de 3.9 μm. La longitud de las microestructuras es de decenas de micrómetros.

Este espesor puede variar debido a las características del medio en donde el hongo se encuentre (la fuente de carbono usada como nutriente, la cantidad de nutriente, el pH, la etapa de crecimiento, etc.); inclusive se ha reportado que, en altas concentraciones de sal, el espesor de la PCe puede alcanzar hasta 1 μm , o que, en algunos casos, ocurre lo contrario y disminuye el espesor de la PCe (alrededor de 64 nm) [1, 10-14]. Asimismo, se ha reportado la naturaleza porosa de la PCe; Aunque son muy pocos los reportes, estos señalan que el tamaño y la distribución de los poros en la PCe dependerá de la etapa de vida en que se encuentre el hongo y de las características del medio a las que esté sometido durante su crecimiento [15-17]. El tamaño de poro reportado va de 35 a 200 nm [15-17]; los valores cercanos al extremo superior se observan en hongos sometidos a algún tipo de estrés; 400 nm para estrés oxidativo, por ejemplo [18].

Entonces, gracias a que se mueven aleatoriamente (movimiento browniano), las NPs-Au de la solución coloidal pueden introducirse en la pared celular de las hifas a través de los poros y transitar por ellos (Fig. 4.11(b)). Una vez dentro, se pueden adherir en el interior de la PCe por medio de los constituyentes de esta, permitiendo la entrada de más NPs y su aglomeración gradual (Fig. 4.11(c)). La adherencia de las NPs mediante los constituyentes de la PCe es debida a dos mecanismos de interacción. En el primero, las moléculas (de DG, AcDGO y/o de cadenas de polisacáridos) que surfactan las NPs-Au se llegan a enlazar con los constituyentes de la pared celular (Fig. 4.11(d)) por medio de puentes de hidrógeno, ya que se ha reportado [19] que los constituyentes mismos de la PCe, formados por monómeros de DG, se llegan a enlazar entre ellos precisamente por medio de puentes de hidrógeno. Entonces, mientras las NPs están adheridas a la PCe, es muy probable que las moléculas de DGs que las surfactan sean desenlazadas de su superficie por enzimas que el

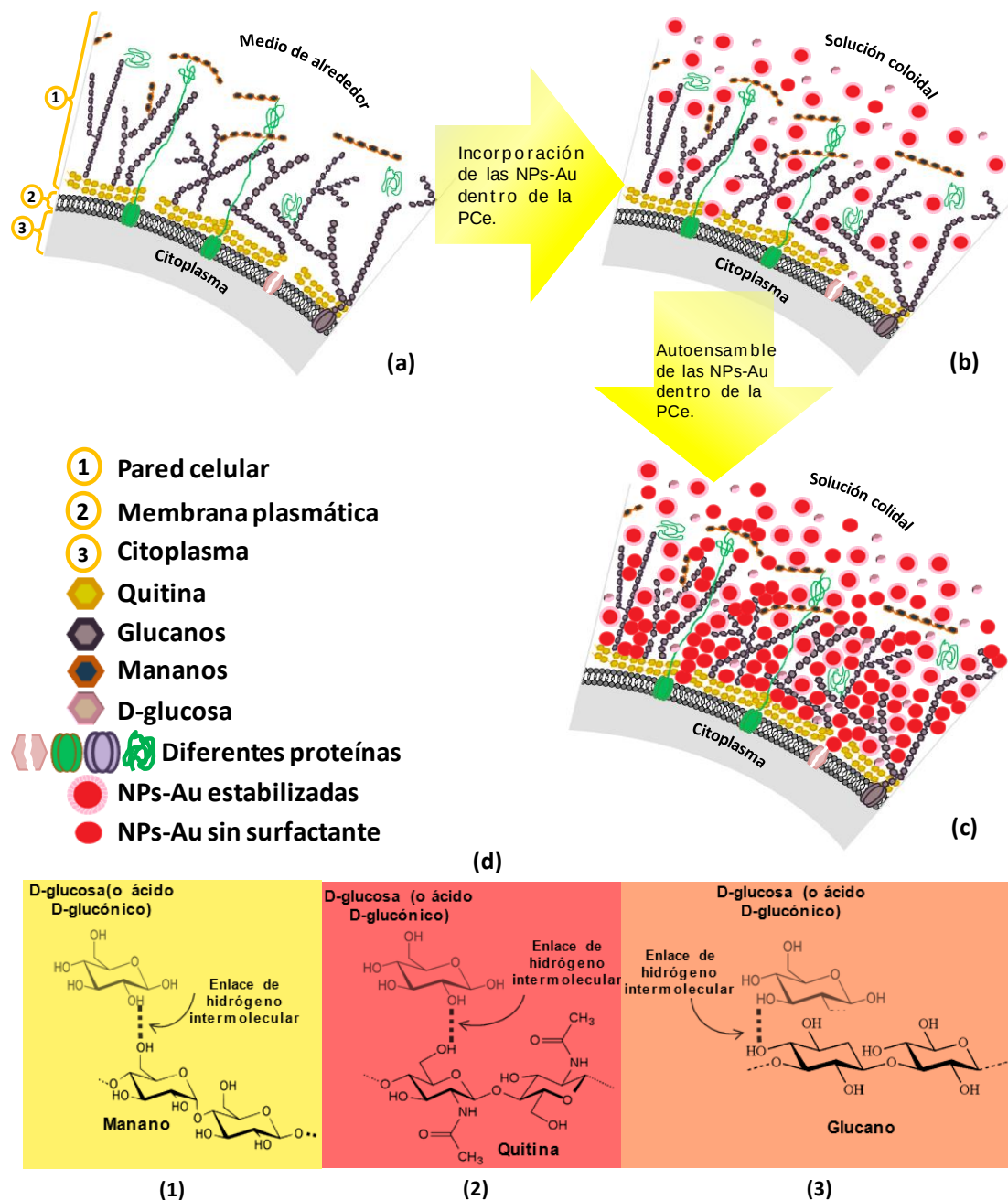


Figura 4.11. Esquemas ilustrativos del autoensamble de NPs-Au en la pared celular de la hifa del hongo: (a) la PCe y sus principales constituyentes (mananos, glucanos y quitina), (b) entrada de las NPs-Au a través de los poros de la pared celular y su interacción con los constituyentes de la PCe, (c) las NPs-Au estabilizadas y desestabilizadas (por enzimas secretadas por el hongo) son retenidas y se aglomeran en la PCe y (d) enlaces de puente de hidrógeno que se pueden formar entre las moléculas (DG, AcDGo y polisacáridos) que surfactan a las NPs-Au y los constituyentes de la PCe (1. mananos, 2. glucanos y 3. quitina).

hongo esté secretando. Así, las NPs se desestabilizan y esto provoca su aglomeración y coalescencia. El segundo mecanismo es para el caso en que las NPs estén desestabilizadas por la falta de surfactantes (por enzimas que el hongo secreta). En este caso, las NPs-Au permanecerán adheridas a la pared celular, pero ahora por interacciones electrostáticas entre la superficie positiva de las NPs-Au y los grupos OH de los constituyentes de la PCe.

De igual forma, las NPs-Au pueden llegar hasta la membrana plasmática, pero, debido al tamaño de la mayoría de las NPs-Au, no podrán atravesarla; de lo contrario, la abundancia excesiva de oro en su interior no permitiría a la hifa crecer y desarrollarse de manera apreciable. Por lo tanto, las NPs se acumulan y ensamblan mayormente en el interior de la PCe y sobre la superficie de esta, y no en el material citoplasmático. Es por eso que las estructuras metálicas de Au (Fig. 4.10) son de forma tubular. Si la cantidad de NPs-Au en la PCe es pobre, las microestructuras colapsarán durante el proceso de TT, al calcinar la bioplantilla (el soporte), y darán lugar a las microestructuras planas (Fig. 4.10).

En la imagen SEM de la figura 4.12(a) se puede ver una parte de una estructura híbrida con muy pocas NPs-Au. Se aprecia que las NPs no solamente están ubicadas en la superficie de la hifa sino que se encuentran en su interior (principalmente dentro de la PCe), ya que algunas de las NPs-Au se ven opacas, y esto es debido a que existe una gran cantidad de materia orgánica por encima de ellas que no puede ser atravesada por muchos electrones secundarios que provienen de las NPs. Caso contrario al de las NPs-Au que se encuentran en la superficie (o muy cerca), que se ven brillantes. En la figura 4.12(b) se observa una estructura con pocas NPs-Au que fue sometida a TT sin que se haya retirado totalmente la bioplantilla (la estructura se ha señalado con una flecha blanca en la imagen insertada). Por eso, a pesar de las pocas NPs y de los grandes espacios existentes entre ellas, la estructura

no ha colapsado totalmente y mantiene una apariencia tubular gracias al material orgánico remanente que la soporta. Esta clase de estructuras híbridas, que en las imágenes de microscopía óptica se notaban como pintadas del color de la solución coloidal, simplemente colapsan al retirar totalmente la bioplantilla, como se observa en la figura 4.12(c). De igual forma, las estructura híbridas que se veían oscuras forman estructuras planas pero mucho más densas (Fig. 4.12d)). A diferencia de estas, las estructuras híbridas que tienen una gran cantidad de NPs ensambladas (las estructura híbridas negras), al extraer completamente la bioplantilla, mantienen sus paredes rígidas, dando lugar a las microestructuras tubulares. La figura 4.12(e) es un esquema de la agregación de las NPs-Au coloidales (esferas amarillas) dentro y sobre la PCe de la hifa y de la formación, después de la extracción de la bioplantilla, de los microtubos por la coalescencia de las NPs-Au. La figura 4.13(a) muestra una imagen del mapeo elemental de una parte de una microestructura tubular de Au (imagen SEM insertada). Nos deja ver que la estructura está constituida por una distribución general de Au, como de igual forma lo revelan las líneas de emisión del Au en el espectro EDS que aparece en la figura 4.13(b).

En el caso de la incorporación de las NPs-Ag, que lleva a la formación de estructuras híbridas hongo/NPs-Ag, ocurre el mismo mecanismo explicado anteriormente, ya que el tamaño de estas NPs es cercano al de las NPs-Au. Los resultados arrojados, en general, por las imágenes ópticas de las estructuras hongo/NPs-Ag son parecidos a las de las estructuras hongo/Au, y tanto las NPs-Au como las NPs-Ag tienen el mismo surfactante. Sin embargo, la incorporación de las NPs de Zn en las hifas del hongo acontece de diferente forma a la incorporación de las NPs de Au y Ag. Esto es evidenciado por las imágenes ópticas de las estructuras híbridas que fueron expuestas en la sección 4.2.3. En esas imágenes (Fig.4.6) se

puede observar que la obstrucción de la luz ocurre solamente en la zona axial (en el eje) de la hifa, que aparece oscura, mientras que fuera de esa zona todo luce claro y bien definido. Que la luz no se transmita a través de la parte axial de la hifa, a diferencia de lo que ocurre en una hifa normal, nos indica la presencia de NPs-Zn en la zona axial de la hifa (Fig.4.14). Es por esto que las estructuras híbridas mantienen la forma natural de la hifas (el exterior de estas estructuras luce como una simple hifa, al contrario de lo que ocurre con las estructuras híbridas de Au y Ag) y tienen, por ejemplo, un diámetro casi igual al de una hifa simple, ya que no existe (o es mínima) la aglomeración de NPs, ni en la PCe ni en la superficie de la hifa, que provoque un aumento del diámetro o que induzca la torsión o curvatura de las hifas. En el caso de las otras dos estructuras híbridas, las de Au y Ag, las NPs son incorporadas en la PCe de la hifa y, como sabemos, esto da rigidez a la hifa, pero, además, al estarse incorporando las NPs, se crean tensiones en la hifa que dan lugar a hifas torcidas y dobladas (tabla 4.1). Solamente en el caso de las estructuras híbridas hongo/NPs-Zn, sucedió en algunas ocasiones que, durante la manipulación del micelio para depositarlo sobre el portaobjetos, las estructuras híbridas se rompían fácilmente, como podemos observar en la imagen de la figura 4.15. En el caso de las estructuras híbridas de los otros dos metales (Au y Ag), al estar las hifas (hifas negras) cubiertas totalmente de NPs, las estructuras híbridas eran muy duras y era más fácil manipularlas para observarlas de manera individual, ya que no se rompían con tanta facilidad.

El mecanismo de incorporación de las NPs-Zn al material citoplasmático de la hifa está principalmente relacionado con el tamaño de la NPs-Zn. Estas partículas tienen un diámetro promedio de alrededor de 3 nm y están surfactadas con moléculas de DG, AcDGo y polisacáridos.

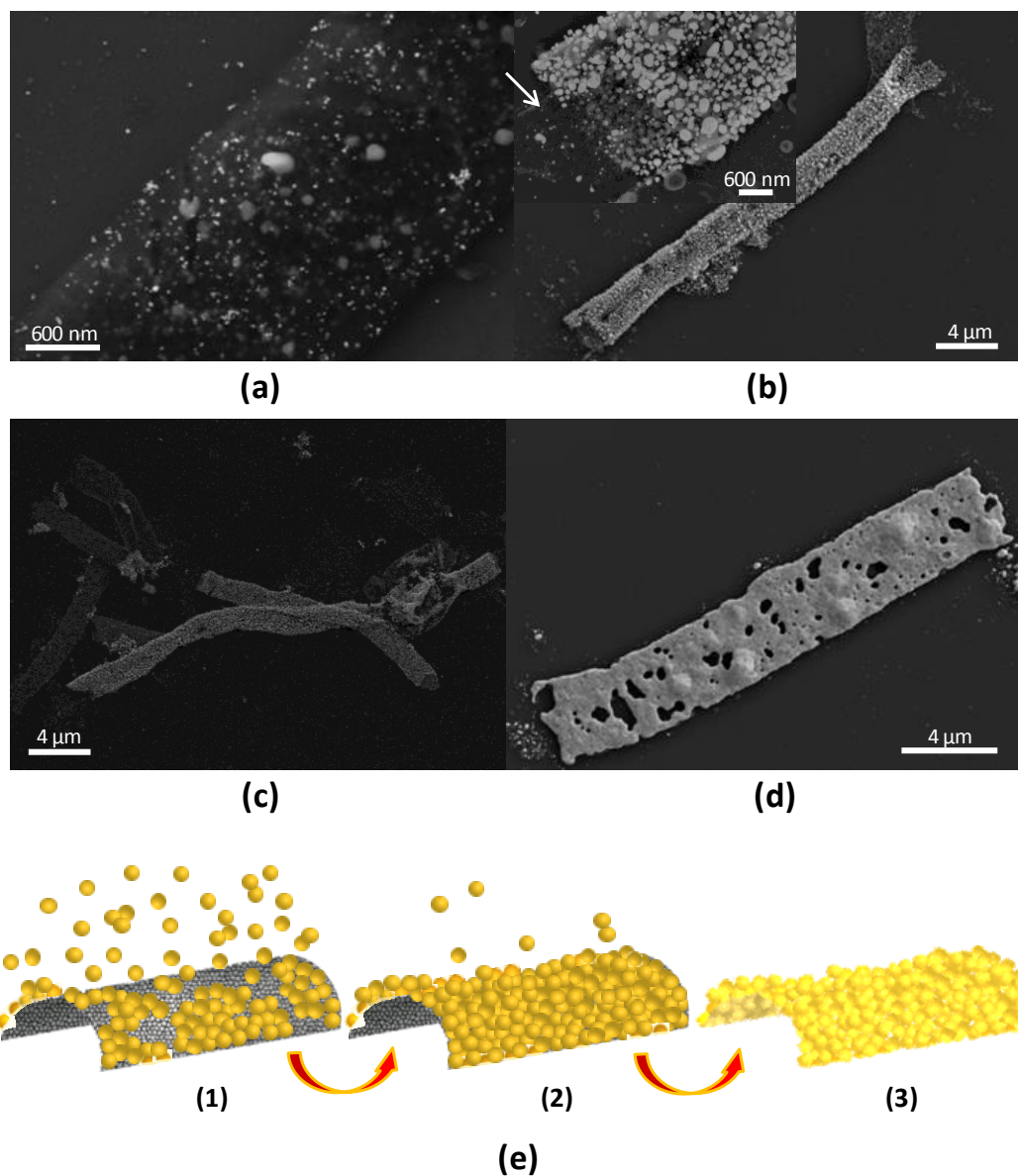


Figura 4.12. (a) Imagen SEM que muestra parte de una estructura híbrida con muy pocas NPs-Au. (b) Estructura con pocas NPs-Au que después del TT conserva residuos de la bioplantilla (señalada con la flecha blanca en la imagen insertada). (c) Microestructuras colapsadas después del TT, debido a la poca cantidad de NPs (estas hifas en microscopía óptica lucen pintadas del color del coloide). (d) Microestructuras planas obtenidas después del TT por colapso, debido a la poca cantidad de NPs; aunque en este caso la cantidad es mayor que en (c); en microscopía óptica, las estructuras híbridas correspondientes se veían oscuras. (e) Esquema de la agregación de las NPs-Au coloidales (esferas amarillas) dentro y sobre la PCe de la hifa (e1 y e2); después de la extracción de la bioplantilla (e3), se forman los microtubos por la interconexión de las NPs-Au (coalescencia de las NPs).

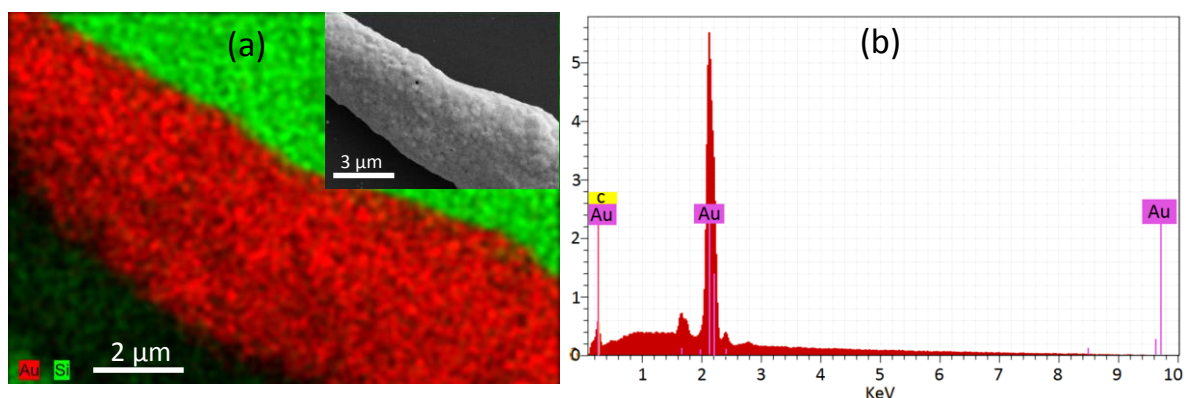


Figura 4.13. (a) Mapeo elemental de una parte de una microestructura tubular de Au (imagen insertada). (b) Espectro EDS de la misma estructura de Au.

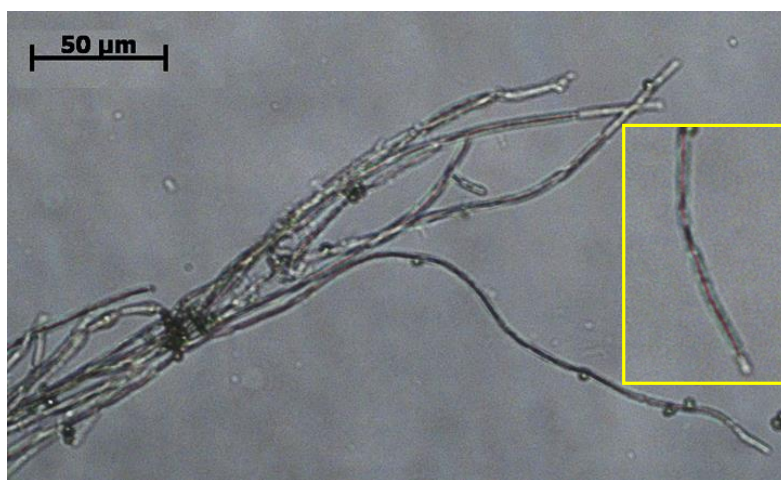


Figura 4.14. Imagen óptica de las estructuras híbridas de Zn. El eje oscuro de las hifas indica la presencia de NPs-Zn en el citoplasma.

Debido a su pequeño tamaño y gracias al movimiento browniano, las NPs-Zn entrarán y se difundirán fácilmente en los poros de la PCe, llegarán a la membrana plasmática y permanecerán cerca de ella. Al acumularse sobre la membrana plasmática y debido a la fluidez de la bicapa lipídica, se crean espacios (o poros) en la membrana por donde las NPs de determinado tamaño y de forma y composición determinados de su surfactante pueden penetrar [20-22], llegar hasta el material citoplasmático y acumularse en la zona axial de la hifa (como se observa en la imagen ampliada en Fig.4.14). Esto es sustentado por

diferentes trabajos que reportan que NPs metálicas de tamaños menores de 5 nm y NPs metálicas estabilizadas con moléculas específicas (derivados de moléculas de DG) han logrado atravesar por este mecanismo, la membrana plasmática en ambos casos, sin dañarla [20-22].

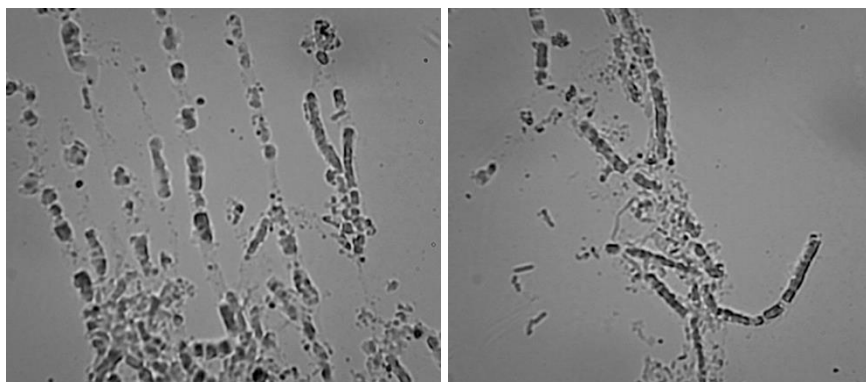


Figura 4.15. Imágenes ópticas de estructuras híbridas de Zn. La fragmentación ocurre durante la colocación de la muestra en el portaobjetos e indica la fragilidad a lo largo de las estructuras (hifas).

La generación de estructuras híbridas de hongo/NPs-Ag y hongo/NPs-Zn no han sido reportadas. Además, aunque algunos trabajos han reportado la obtención de estructuras hongo/NPs-Au y, con estas, la obtención de estructuras de forma tubular similares a las obtenidas en este trabajo [23-26], sus posibles aplicaciones han quedado limitadas por las características de las microestructuras obtenidas. Por lo tanto, es reportada por primera vez (en la siguiente sección) la aplicación de microtubos de Au obtenidos por autoensamble de NPs-Au mediante bioplantillas como eficientes sustratos SERS.

4.4. Aplicación de las microestructuras tubulares de Au como sustratos SERS

Los microtubos nanoestructurados obtenidos de las estructuras híbridas hongo/NPs-Au después de calcinar la bioplantilla son ideales para aplicaciones como sustratos SERS debido al tipo de metal de que están hechas, a las características de su superficie (rugosa y

porosa) y a su forma tubular. Como sabemos, en SERS se usan sustratos metálicos de superficie rugosa. Gracias a la rugosidad, los sustratos presentan un gran número de *hotspots* en los que se amplifica la dispersión Raman de las moléculas que se encuentren adsorbidas en los sustratos o muy cerca de ellos. Por otra parte, gracias a la forma tubular, el área iluminada por el haz del láser del equipo Raman es mayor y eso hace aumentar la cantidad de moléculas que pueden interaccionar con el haz.

Los analitos utilizados para las pruebas de SERS fueron los siguientes: azul de metileno (AZM), rodamina 6G (R6G), naranja de metilo (NMO) y moléculas de DG (DG). La concentración de las soluciones preparadas fue de 15.6 μM , 10.5 μM y 15.3 μM para las primeras tres moléculas orgánicas, respectivamente, y de 25 mM para la DG. En cada caso, se pone una gota de la solución sobre un sustrato de Si, donde se encuentran las microestructuras, que después es colocado bajo la lente del microscopio del equipo Raman para la medición.

La figura 4.16 muestra los resultados obtenidos después de las mediciones Raman. La señal Raman mostrada en la figura 4.16 I(a)-IV(a), es el espectro Raman normal de la solución extendida sobre el sustrato de Si, es decir, cuando el láser se enfoca sobre el Si y no sobre las microestructuras. En este caso, no se detectó señal Raman de ninguno de los cuatro analitos (AZM, R6G, NMO, DG). El único pico observado está ubicado en 520 cm^{-1} y está asociado al modo fonónico transversal óptico fundamental (TO) del Si. Por otro lado, cuando el láser se enfoca sobre los microtubos de Au cubiertos con la solución, se obtiene una gran señal Raman, es decir, una respuesta SERS (Fig. 4.16 I(b)-IV(b)). Esto ocurrió para las cuatro moléculas analizadas y las intensidades de la señal SERS fueron de hasta mil veces la señal Raman normal. El espectro SERS en cada caso exhibe las bandas

características asociadas a los modos vibracionales de la molécula respectiva (en el apéndice E se presenta una tabla que ubica los modos vibracionales exhibidos en los espectros SERS). En la figura que muestra el espectro SERS de la DG (Fig. 4.16(IV)), hemos insertado una gráfica Raman de la DG en agua. Esta gráfica fue generada con el programa Gauss06 con el fin de auxiliarnos en la identificación de los modos vibracionales Raman de la molécula, debido a los pocos reportes de datos experimentales.

Una forma de conocer el aumento o amplificación promedio de la respuesta SERS para los diferentes analitos consiste en calcular el factor de aumento (FA) promedio, el cual es definido en el apéndice F. Los resultados para el FA en cada caso se presentan en la tabla 4.2; se encuentra que la respuesta SERS de R6G es la máxima, con un valor de FA de 2.65×10^{11} , y el de la molécula de DG, la mínima, con un FA de 1.76×10^{10} .

La señal de SERS fue medida en dos puntos diferentes de la microestructura de Au para observar si existía alguna variación o atenuación de la respuesta. En la figura 4.17 se muestran los espectros SERS obtenidos en dos zonas diferentes de la microestructura para moléculas de AZM y R6G.

Se realizaron mediciones de SERS con soluciones de AZM a diferentes concentraciones para evaluar la sensibilidad de nuestros sustratos SERS, es decir, la concentración mínima requerida para que la señal sea detectable. En la gráfica 4.18 se observan los espectros SERS obtenidos para concentraciones de 1 ppm ($3.12 \mu\text{M}$), 0.5 ppm ($1.56 \mu\text{M}$), 0.05 ppm ($0.1 \mu\text{M}$) y 0.01 ppm ($0.03 \mu\text{M}$). Se puede ver que la concentración mínima de AZM para la que se obtiene señal es de aproximadamente $0.1 \mu\text{M}$.

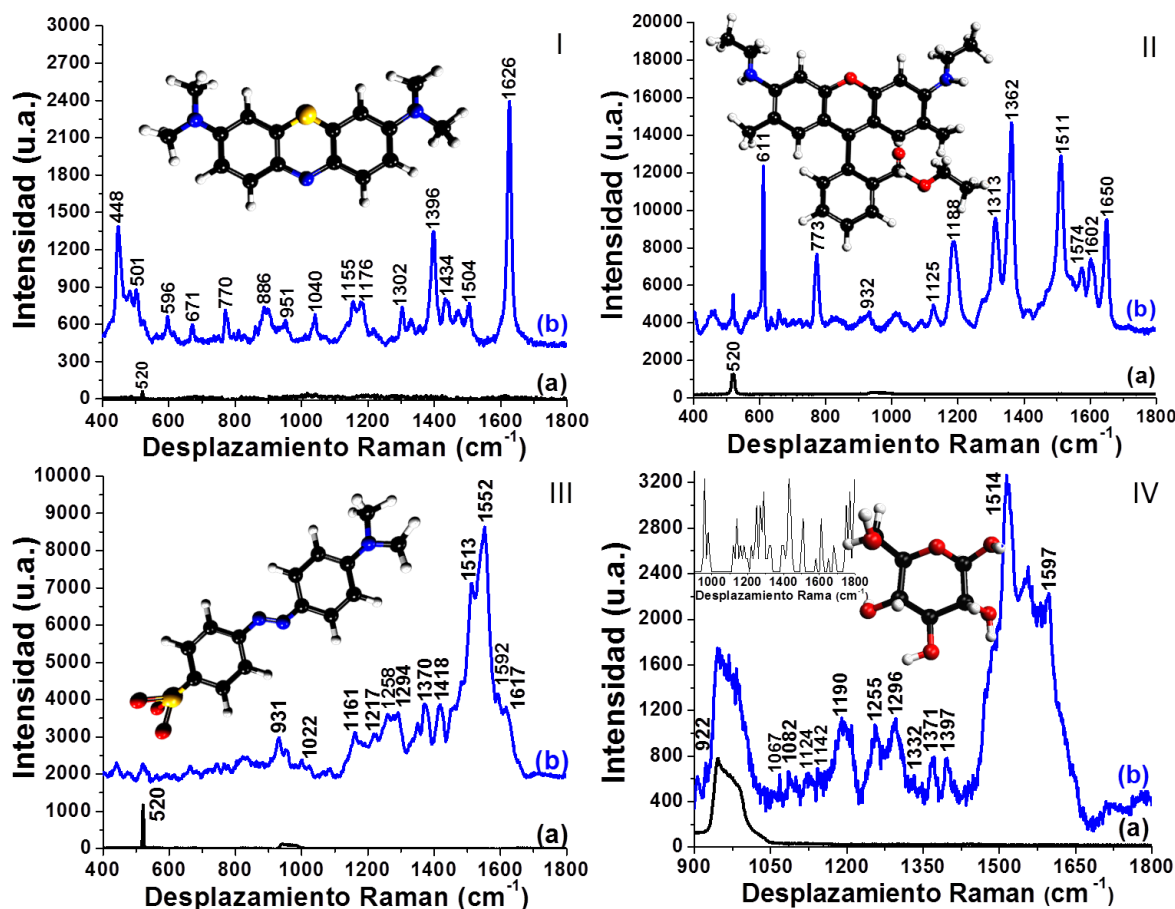


Figura 4.16. Espectros (a) Raman y (b) SERS de (I) AZM, (II) R6G, (III) NMO y (IV) DG. Los espectros SERS presentados ((I-IV)b) se obtuvieron con las moléculas del analito presentes sobre los microtubos de Au. En el espectro Raman normal de los analitos ((I-IV)a) se observa únicamente el pico asociado al modo vibracional del Si de bulto (520 cm^{-1}). En cada imagen se ha insertado un esquema de la molécula analito correspondiente.

Tabla 4.2. Valores del FA promedio calculados para los analitos AZM, R6G, NMO y DG.

Analitos	Factor de aumento (FA)
R6G	2.65×10^{11}
AZM	3.23×10^{10}
NMO	2.63×10^{11}
DG	1.76×10^{10}

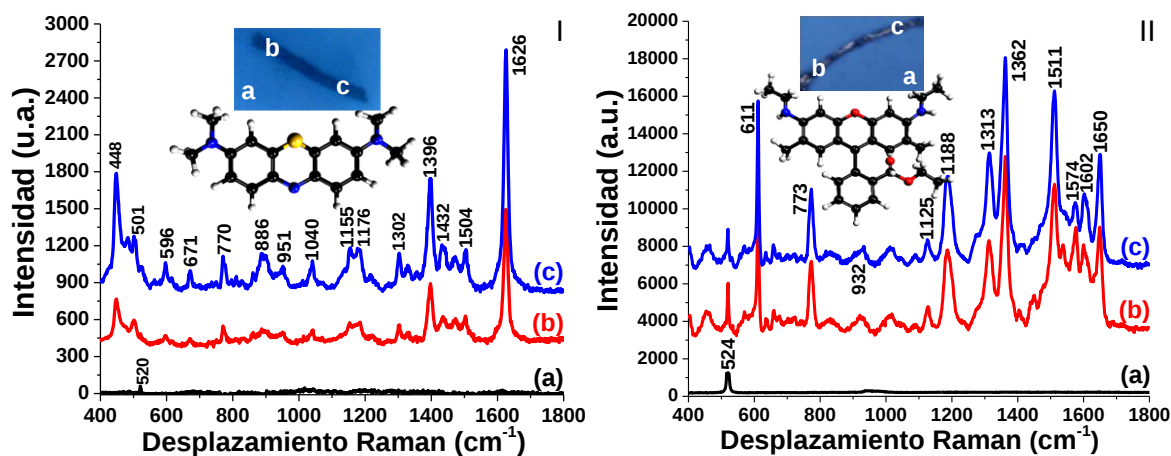


Figura 4.17. Espectros SERS de las soluciones de (I) AZM y (II) R6G obtenidos (a) del sustrato de silicio sin microestructura y (b y c) de dos diferentes puntos de la microestructura de Au (en la imagen insertada se muestran los puntos donde fueron realizadas las mediciones SERS).

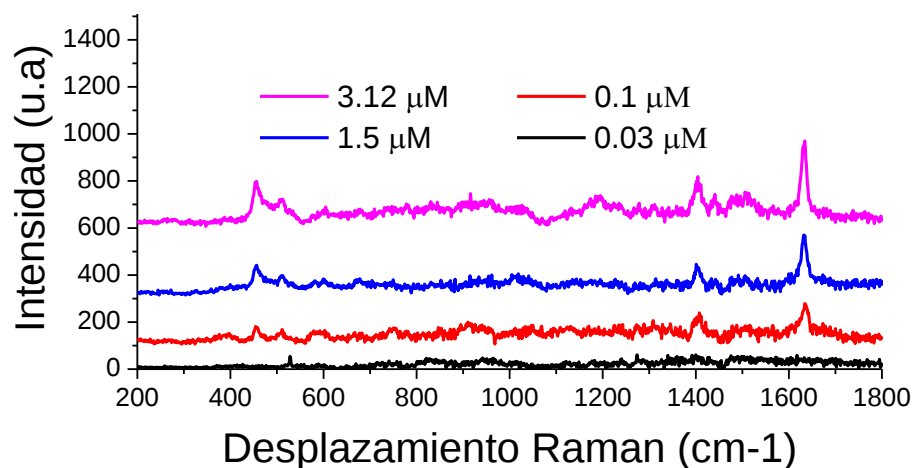


Figura 4.18. Espectros SERS de la solución de AZM a diferentes concentraciones: (a) 1 ppm (3.12 μ M), (b) 0.5 ppm (1.5 μ M), (c) 0.05 ppm (0.1 μ M) y (d) 0.01 ppm (0.03 μ M). Siendo 0.05 ppm la concentración mínima para la que se obtiene una señal detectable.

4.4.1 Resultados y discusión de SERS

Los espectros Raman normales de cada analito, denotados mediante (a) en la figura 4.16, no exhiben bandas asociadas a los modos vibracionales de ninguno de ellos, debido a la baja concentración de las moléculas en la solución. La respuesta SERS, denotada por (b) en

la Fig. 4.16, se obtiene cuando el láser está enfocado sobre las microestructuras de Au que fueron cubiertas por la gota de la solución del analito. La concentración del analito en ambas mediciones (Raman y SERS) es la misma.

La señal SERS de todas las muestras es generada debido a la naturaleza metálica y nanoestructurada de las microtubos de Au; específicamente, gracias a la presencia de *hotspots* que incrementan enormemente el campo eléctrico local. La coalescencia parcial de las NPs plasmónicas es la responsable de los *hotspots* de la superficie de los microtubos de Au. La resonancia entre el campo eléctrico incidente y el plasmón de las NPs-M genera un campo local que intensifica la respuesta de los modos vibracionales de las moléculas que se encuentran adsorbidas o en la proximidad de la superficie de la microestructura.

En cuanto a las diferencias de intensidades de los espectros SERS de los analitos, nótese que los generados por las moléculas de R6G y NMO son los más intensos (el FA promedio es de 10^{11} ; ver la tabla 4.2), siendo los del AZM y DG los menos intensos (10^{10}). Si suponemos que el campo local generado en todos los sustratos SERS es el mismo (o casi el mismo), entonces el FA de la DG, a pesar de que la concentración de esta es mucho mayor que la de las otras moléculas, no es el más alto debido a que la molécula tiene una sección transversal de dispersión Raman muy pequeña (5.6×10^{-30}) [27, 28], lo que hace, inclusive, que sea siempre muy difícil detectarla [27-29] en comparación con la molécula de R6G, que tiene una sección trasversal Raman más grande (10^{-24} - 10^{-26}). [29, 30].

De los espectros SERS de AZM y R6G medidos en dos zonas distintas de los microtubos de Au (Fig. 4.16 I(a,b) y II(a,b)), se ve que las intensidades de los espectros SERS para el mismo analito no llegan a ser estrictamente idénticas. Sin embargo, la máxima diferencia

entre las intensidades es menor que un orden de magnitud (apéndice). Estas diferencias resultan de la variación de la cantidad de *hotspots* a lo largo de las microestructuras. La variación de la cantidad de *hotspots* a lo largo de la microestructura es provocada principalmente por:

- El ensamble aleatorio de las NPs-Au a lo largo de las microestructuras que no llega a ser homogéneo, resultando en áreas de mayor o menor densidad de NPs.
- La manera en que coalescen las NPs de la superficie de la microestructura, ya que pueden hacerlo formando superficies suaves o rugosas.

Por lo tanto, podemos concluir que las microestructuras de oro que hemos fabricado funcionan como sustratos SERS para detectar bajas concentraciones de analitos (de hasta 0.1 ppm para el caso de AZM; Fig. 4.18) con un FA de hasta 10^{11} , que es un valor alto en comparación con los reportados en la literatura para el mismo material [31-39].

Bibliografía

- [1] J. Deacon. *Fungal Biology*. Blackwell Publishing, Reino Unido, 2006.
- [2] D. H. Griffin. *Fungal Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Publications, Nueva York, 1994.
- [3] S. Gruber y V. Seidl-Seiboth. Self-versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* **158**, 26-34, 2012.
- [4] D. Infante, B. Martínez, N. González y Y. Reyes. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* **24**, 14-21, 2009.
- [5] G. J. Samuel, A. Ismaiel, M. C. Bon, S. De Respinis y O. Petrini. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* **102**, 944-966, 2010.
- [6] Y. K. Jo, B. H. Kim y G. Jung. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* **93**, 1037-1043, 2009.
- [7] T. J. Berger, J. A. Spadaro, R. Bierman, S. E. Chapin y R. O. Becker. Antifungal properties of electrically generated metallic ions. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **10**, 856-860, 1976.
- [8] R. O. Becker. Silver ions in the treatment of local infections. *Metal Based Drugs* **6**, 311-314, 1999.

- [9] K. Malachová, P. Praus, Z. Rybková y O. Kozák. Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied clay science* **53**, 642-645, 2011.
- [10] K. Backhaus, C. J. Heilmann, A. G. Sorgo, G. Purschke, C. G. de Koster, F. M. Klis y J. J. Heinisch. A systematic study of the cell wall composition of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **27**, 647-660, 2010.
- [11] L. Zhao, D. Schaefer, H. Xu, S. J. Modi, W. R. La Course y M. R. Marten. Elastic properties of the cell wall of *Aspergillus nidulans* studied with Atomic Force Microscopy. *Biotechnology Progress* **21**, 292-299, 2005.
- [12] D. Gášková, B. Brodská, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, K. Sigler, O. Benada y J. Plášek. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1189-1197, 1998.
- [13] M. KraljKuncic, T. Kogej, D. Drobne y N. Gunde-Cimerman. Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and environmental microbiology* **76**, 329-337, 2010.
- [14] A. A. Abu-Seidah. Effect of salt stress on amino acids, organic acids and ultrastructure of *Aspergillus flavus* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal Agricultural and Biological* **9**, 419-425, 2007.
- [15] R. S. Pereira RS, N. A. Parizotto y V. Baranauskas. Observation of baker's yeast strains used in biotransformation by atomic force microscopy. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **59**, 135-143, 1996.

- [16] R. Scherrer, E. Berlin y P. Gerhardt. Density, porosity, and structure of dried cell walls isolated from *Bacillus megaterium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **129**, 1162-1164, 1977.
- [17] M. Reiter y J. Plášek. AFM study of yeast cell wall. *WDS'06 Proceedings of Contributed Papers Part III*, 111-114, 2006.
- [18] R. S. Pereira y J. Geibel. Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy. *Molecular and Cellular Biochemistry* **201**, 17-24, 1999.
- [19] E. Cabib, D. H. Roh, M. Schmidt, L. B. Crotti y A. Varma. The yeast cell wall and septumas paradigms of cell growth and morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 19679-19682, 2001.
- [20] R. C. Van Lehn, P. U. Atukorale, R. P. Carney, Y. S. Yang, F. Stellacci, D. J. Irvine y A. Alexander-Katz. Effect of particle diameter and surface composition on the spontaneous fusion of monolayer-protected gold nanoparticles with lipid bilayers. *Nano Letters* **13**, 4060-4067, 2013.
- [21] A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H. S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine y F. Stellacci. Surface structure-regulated cell membrane penetration by monolayer protected nanoparticles. *Nature Materials* **7**, 588–595, 2008.
- [22] S. Hong, P. R. Leroueil, E. K. Janus, J. L. Peters, M. M. Kober, M. T. Islam, B. G. Orr, J. R. Baker Jr. y M. M. Banaszak Holl. Interaction of polycationic polymers with

supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjugate Chemistry* **17**, 728-734, 2006.

[23] A. Rehman, M. I. Majeed, A. Ihsan, S. Z. Hussain, S. Rehman, M. A. Ghauri, Z. M. Khalid y I. Hussain. Living fungal hyphae-templated porous gold microwires using nanoparticles as building blocks. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 6747-6754, 2011.

[24] Z. Li, S. W. Chung, J. M. Nam, D. S. Ginger y C. A. Mirkin. Living templates for the hierarchical assembly of gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 2306-2309, 2003.

[25] A. M. Fontes, R. Geris, A. V. dos Santos, M. G. Pereira, J. G. S. Ramalho, A. F. da Silva y M. Malta. Bio-inspired gold microtubes based on the morphology of filamentous fungi. *Biomaterials Science* **2**, 956-960, 2014.

[26] N. C. Bigall, M. Reitzig, W. Naumann, P. Simon, K. H. Van Pée y A. Eychmüller. Fungal templates for noble-metal nanoparticles and their application in catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 7876-7879, 2008.

[27] R. L. McCreery. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. John Wiley & Sons, Nueva York, 2000.

[28] K. E. Shafer-Peltier, C. L. Haynes, M. R. Glucksberg y R. P. Van Duyne. Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 588-593, 2003.

[29] S. A. Meyer, E. C. Le Ru y P. G. Etchegoin. Quantifying resonant Raman cross sections with SERS. *Journal of Physical Chemistry A* **114**, 5515–5519, 2010.

- [30] L. Jensen y G. C. Schatz. Resonance Raman scattering of rhodamine 6G as calculated using time-dependent density functional theory. *Journal of Physical Chemistry A* **110**, 5973-5977, 2006.
- [31] Y. Lu, G. L. Liu, J. Kim, Y. X. Mejia y L. P. Lee. Nanophotonic crescent moon structures with sharp edge for ultrasensitive biomolecular detection by local electromagnetic field enhancement effect. *Nano Letters* **5**, 119-124, 2005.
- [32] R. R. Naujok, R. V. Duevel y R. M. Corn. Fluorescence and Fourier transform surface-enhanced Raman scattering measurements of methylene blue adsorbed onto a sulfur-modified gold electrode. *Langmuir* **9**, 1771-1774, 1993.
- [33] N. L. Garrett, P. Vukusic, F. Ogrin, E. Sirotkin, C. P. Winlove y J. Moger. Spectroscopy on the wing: naturally inspired SERS substrates for biochemical analysis. *Journal of Biophotonics* **2**, 157-166, 2009.
- [34] N. Félidj, J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, M. Salerno, G. Schider, B. Lamprecht, A. Leitner y F. R. Aussenegg. Controlling the optical response of regular arrays of gold particles for surface-enhanced Raman scattering. *Physical Review B* **65**, 075419, 2002.
- [35] N. Félidj, J. Aubard, G. Lévi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner y F. R. Aussenegg. Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays. *Applied Physics Letters* **82**, 3095, 2003.
- [36] C. Ruan, W. Wang y B. Gu. Single-molecule detection of thionine on aggregated gold nanoparticles by surface enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 568-573, 2007.

- [37] G. Laurent, N. Féridj, S. L. Truong, J. Aubard y G. Lévi. Imaging surface plasmon of gold nanoparticle arrays by far-field Raman scattering. *Nano Letters* **5**, 253-258, 2005.
- [38] G. Laurent, N. Féridj, J. Grand, J. Aubard, y G. Lévi. Raman scattering images and spectra of gold ring arrays. *Physical Review B* **73**, 245417, 2006.
- [39] K. Quester, M. Avalos-Borja, A. R. Vilchis-Nestor, M. A. Camacho-López y E. Castro-Longoria. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLOS ONE* **8**, e77486, 2013.

Conclusiones

En este trabajo, se realizó de manera *verde* la síntesis de NPs metálicas (Au, Ag, Zn) usando ADI como solvente y materiales orgánicos (EP y DG) como reductores y estabilizadores. Se indujo el autoensamble de las NPs de Au prefabricadas por medio de bioplantillas vivas consistentes de hongos filamentosos no patógenos, para fabricar microestructuras plasmónicas. Las microestructuras fueron utilizadas como detectores SERS para detección de moléculas orgánicas. De los estudios realizados se puede concluir que:

- Es posible fabricar nanopartículas de metales nobles y no nobles de manera verde utilizando reductores y estabilizadores orgánicos como DG y EP. Las nanopartículas fabricadas por este método son bastante estables y, gracias al método verde de síntesis, podrían tener buena biocompatibilidad.
- El ambiente de reacción, el pH de la solución, por ejemplo, controla fuertemente el proceso de reducción de los iones metálicos en el proceso de biosíntesis. La razón de reducción y la formación de las nanopartículas metálicas en el proceso de bio-reducción es relativamente lento, debido la naturaleza suave de reductores como la DG y el EP. Aunque el potencial de reducción estándar de los iones metálicos investigados en este trabajo tiene el orden $\text{Au}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Zn}^{2+}$, en soluciones básicas,

por la formación de complejos, el potencial de reducción de estos iones cambia drásticamente.

- Los hongos filamentosos, como el *Trychoderma asperellum* (Tas) y el *Aspergillus sydowii* (Asy), pueden crecer en las soluciones coloidales de DG y EP, neutras o ligeramente básicas, a temperatura ambiente.
- Mientras que la presencia de NPs de Au y Ag no perjudica el crecimiento de los hongos Tas y Asy en una solución de DG, la presencia de NPs de Zn en concentraciones altas inhibe el crecimiento de estos hongos.
- Durante el crecimiento de los hongos en soluciones coloidales de Au, las NPs de Au se adhieren a la pared celular, formando microestructuras híbridas hongo/NPs-Au. Debido a su tamaño, las NPs-Au no se pueden incorporar al citoplasma de los hongos.
- Por medio de tratamientos térmicos controlados, es posible eliminar los materiales orgánicos (incluso la DG) de las microestructuras híbridas y fabricar microestructuras de Au porosas con superficies rugosas, las cuales tienen potencial para ser utilizadas como eficientes sustratos SERS.
- Las pruebas SERS de los microtubos de Au, fabricados en este trabajo mediante una técnica completamente verde, indican que estas microestructuras son altamente eficientes para la detección de moléculas orgánicas.
- La eficiencia de detección de nuestras microestructuras plasmónicas es muy alta ($AF = 10^{10}$ - 10^{11}) en comparación con la de los sustratos SERS fabricados anteriormente por métodos similares.

Los detectores fabricados en este trabajo no solo tienen alta sensibilidad (de hasta 0.05 ppm para AMN), también son robustos y tienen carbono impregnado en la pared. La presencia de carbono en la pared porosa no solo mejora las propiedades mecánicas de los microtubos, también mejora su eficiencia en la detección de moléculas orgánicas por la alta afinidad de adsorción de las moléculas orgánicas con el carbono.

Apéndice A

Procesos de cultivo e inoculación de las bioplantillas

Las cepas de los hongos *Trichoderma asperellum* (*Tas*) y *Aspergillus sydowii* (*Asy*) fueron cultivadas en un medio de PDA. El proceso fue el siguiente:

- En cajas de Petri con PDA (previamente preparado y esterilizado) fueron inoculadas las esporas de *Tas* y *Asy* (Figura A1(a)).
- Posteriormente, las cajas de Petri donde fueron inoculadas las esporas se tapan y se almacenan en la incubadora (sin luz y a temperatura de 37°C, Fig.A1(b)). Después de 5 días, se observa que el hongo ha crecido en toda la caja de Petri (ver Figura A1(c)).

Estos hongos cultivados serán inoculados en las soluciones coloidales de NPs-M (Au, Ag y Zn).

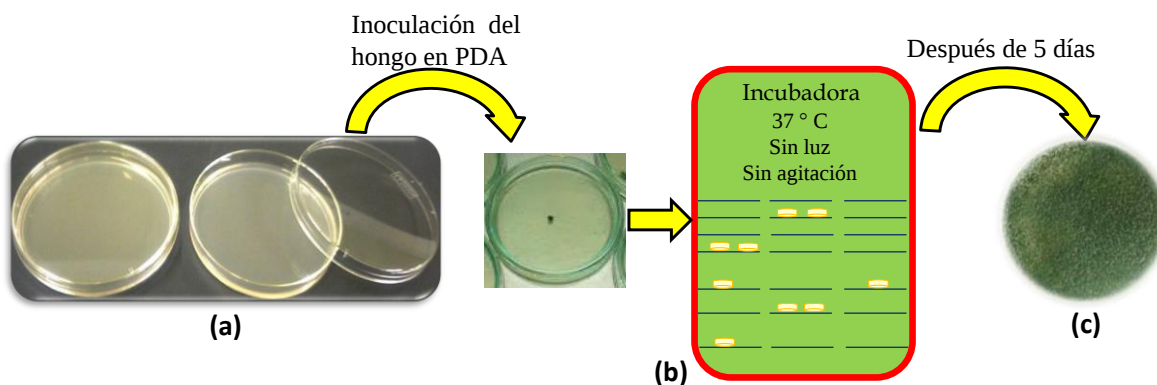


Figura A1. (a) Imagen del medio de cultivo (PDA) en una caja de Petri; (b) Imagen del hongo inoculado en el medio de PDA y esquema que indica el almacenamiento de éste en la incubadora; (c) después de 5 días se observa la colonia del hongo (*Tas*) que ha crecido en toda la caja de Petri.

Proceso de inoculación de las esporas de los hongos en las soluciones coloidales de NPs-M

El proceso de inoculación de las esporas de los hongos en las soluciones coloidales de NPs-M (Au, Ag y Zn) fue el siguiente:

- Con un asa bacteriológica de punta (previamente esterilizada), se raspa superficialmente, con cuidado, una zona del hongo cultivado en cajas de Petri (Fig. A2(a)), con la intención de tomar las esporas del hongo localizadas en la superficie (es bueno recordar que las hifas del hongo se entierran en el sustrato y que las esporas siempre se encuentran en la superficie y son las responsables del color verdoso que vemos macroscópicamente).
- Las esporas recogidas son inoculadas en un frasco (un vial) de vidrio que contiene 5 mL de la solución coloidal de NPs-M (Fig. A2(b)).
- Posteriormente, el frasco y su tapa son flameados, y el frasco se cierra inmediatamente y se almacena en una estufa de incubación. Imagen A2(c) se muestran algunos frascos con soluciones coloidales en las que ha crecido el hongo (20 días después de la inoculación).

Las instrumentos (asas, bisturí, pinzas, etc.) utilizados en cualquier proceso se colocan, al principio, en un frasco con alcohol; luego, se flamean hasta que alcanzan el rojo vivo (con la flama de un mechero) y se dejan enfriar; después de esto, están listos para ser utilizados. Al terminar el proceso de inoculación se repite la esterilización. La esterilización del material es muy importante para matar todas las formas de vida que pudieran contaminar nuestras muestras. Durante todos los procesos, el tipo de esterilización que se llevó a cabo

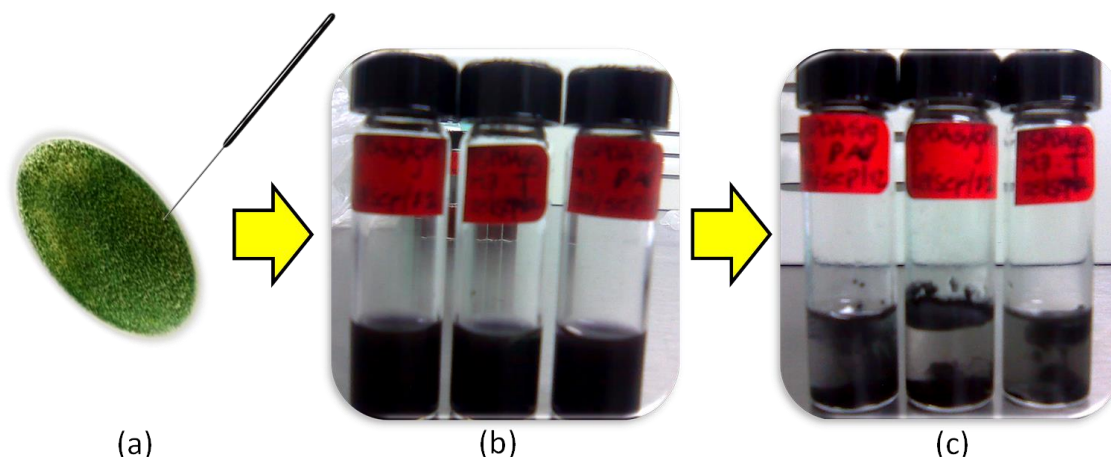


Figura A2. (a) Toma de esporas de hongo cultivado en PDA; (b) inoculación de las esporas en medio coloidal; (c) crecimiento del hongo en la solución coloidal después de 20 días de que se hizo la inoculación.

fue por calor (método físico), en autoclaves (las cuales alcanzan una temperatura de 121°C, temperatura necesaria para acabar con microorganismos que resisten hasta los 100°C) o mediante el método descrito arriba. Toda la manipulación de las bioplantillas fue realizada bajo una campana de flujo laminar (Fig. A3) que siempre se desinfecta con alcohol, antes y después de utilizarla. El uso de cubre bocas y guantes es también recomendable algunas veces, de acuerdo al proceso.



Figura A3. Imagen de la campana de flujo laminar utilizada en los procesos de manipulación de las bioplantillas.

Apéndice B

Espectro de absorción de iones de Zn

En la figura B1 se presenta el espectro de absorción de la solución coloidal de NPs-Zn (con DG). Se observa que la banda asociada a la RPS de las NPs, ubicada alrededor de 323 nm, es menos intensa que la banda en 273 nm asociada a los iones de Zn que hay en la solución [B1].

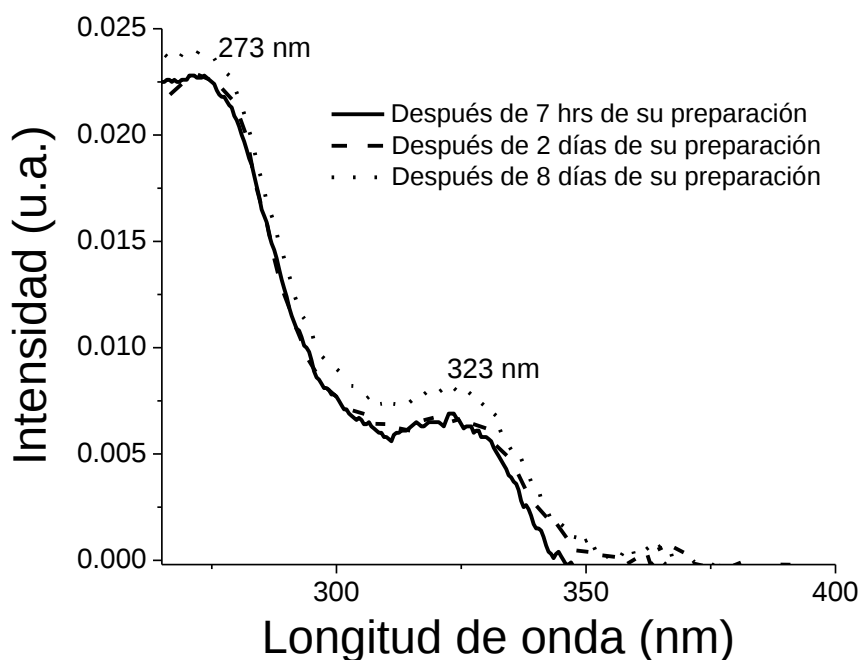


Figura B1. Espectro de absorción de la solución coloidal de NPs-Zn.

[B1] G. Canizal, P.S. Schabes-Retchkiman, U. Pal, Hong Bo Liu, J.A. Ascencio, Controlled synthesis of ZnO nanoparticles by bioreduction, *Materials Chemistry and Physics*, **97**, 321–329, 2006.

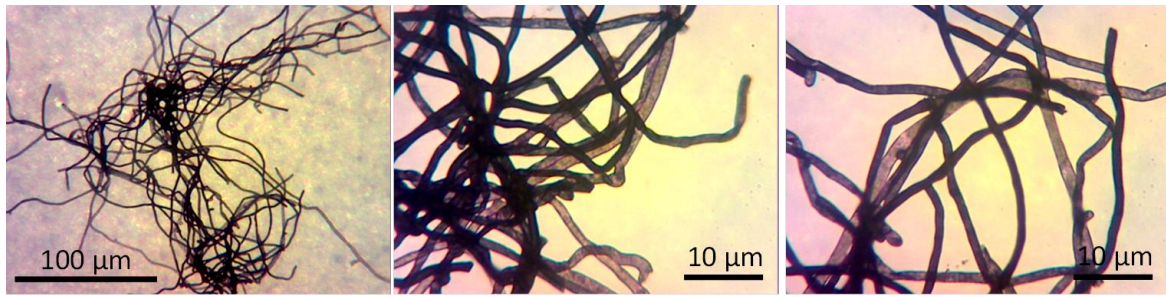
Apéndice C

Procesos de centrifugación y sonicación

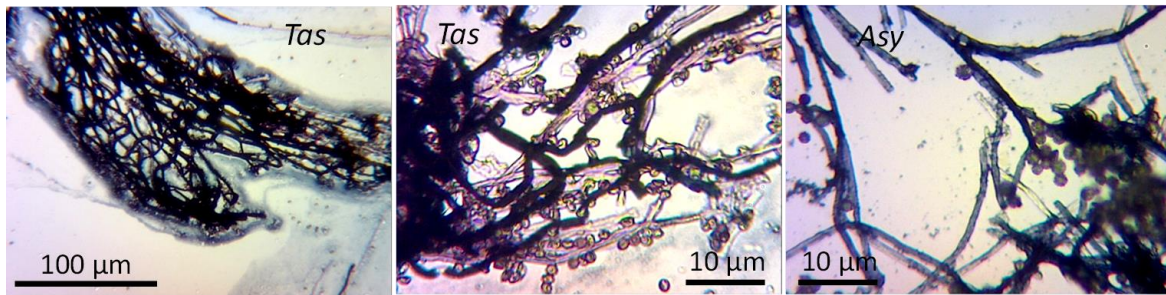
Los procesos de centrifugación y sonicación realizados para limpiar el micelio (de esporas y NPs aglomeradas) que creció en las soluciones coloidales y separar las hifas híbridas de las hifas simples, se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- Con un asa bacteriológica de punta, se extrae el micelio del hongo que creció en la solución coloidal de NPs-M (Au, Ag y Zn) y se coloca en un portaobjetos.
- Se divide el micelio en partes que se depositan en viales para su centrifugación.
- Las muestras se centrifugan a 1000 rpm durante tres minutos. El proceso se repite 5 veces.
- Las muestras se someten después a ultrasonido (37 KHz), para separar lo más posible las hifas, durante dos periodos de 15 segundos.
- Después se vuelve a centrifugar, a 1000 rpm durante tres minutos, 5 veces más.
- Al final, las muestras quedan suspendidas en agua.

En la figura C1 se muestran algunas imágenes de las hifas. Después del proceso de centrifugación y sonicación (Fig. C1(a)), las hifas lucen más limpias, sin NPs aglomeradas y sin esporas, que aquellas que no se sometieron al proceso (Fig. C1(b)).



(a)



(b)

Figura C1. Estructuras híbridas con hifas del hongo (a) *Tas* después del proceso de centrifugación y sonicación; (b) muestras (con estructuras híbridas, hifas y esporas) no centrifugadas ni sonicadas.

Apéndice D

Proceso de extracción de la bioplantilla

Para extraer la bioplantilla de las estructuras híbridas de Au (hongo/NPs-Au) y obtener los microtubos de Au, se llevó a cabo un tratamiento térmico (TT). El proceso realizado fue el siguiente:

- Después del proceso de centrifugación y sonicación, se toma con una pipeta un poco de agua con las estructuras híbridas suspendidas en ella y se depositan dos gotas de esta solución (agua y estructuras híbridas) sobre un sustrato de Si.
- Se deja secar a temperatura ambiente.
- Después, las muestras (estructuras híbridas sobre sustratos de Si) se colocan en barcos de alúmina y se introducen en un horno tubular de reactor de cuarzo bajo flujos de argón y oxígeno (150 ml/s de cada uno); este proceso está esquematizado en la figura D1(a).
- Se hace aumentar la temperatura (a razón de 3 °C/min) desde temperatura ambiente hasta una temperatura de 500 °C, la cual se mantiene durante 3 horas (Fig. D1(b)).
- Se deja enfriar libremente hasta temperatura ambiente, manteniendo los flujos de Ar y O₂ (Fig. D1(b)).

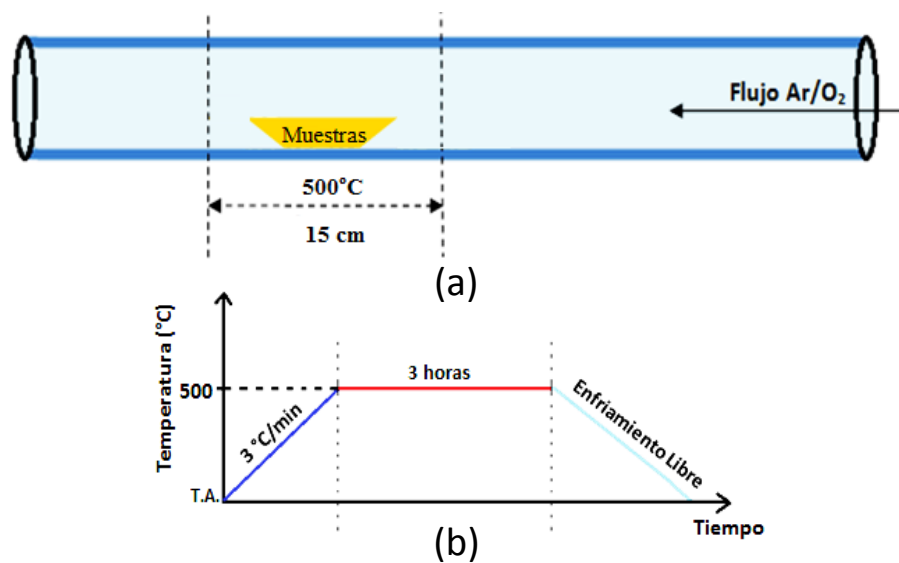


Figura D1. (a) Esquema ilustrativo del tubo de cuarzo colocado en el horno tubular donde fueron tratadas las muestras térmicamente. (b) Gráfica del perfil de temperatura utilizado en el TT.

Apéndice E

Cálculo del factor de aumento (FA)

El FA de sustratos SERS está definido como:

$$F = \left(\frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{NR}/N_{NR}} \right)$$

Donde I_{SERS} e I_{NR} son las intensidades integradas de una misma banda del espectro SERS y del espectro Raman normal, respectivamente, de un analito. N_{NR} es el número de dispersores Raman (moléculas del analito) bajo el spot del láser (sin sustrato SERS) y N_{SERS} es el número de moléculas adsorbidas sobre el sustrato SERS e iluminadas por el láser.

Los picos en 1626 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} y 1514 cm^{-1} de AMO, R6G, NMO y DG, respectivamente, fueron los utilizados para calcular las intensidades integradas. El pequeño intervalo en que se ubican estas bandas fue deconvolucionado (curvas verdes de la Fig. F1) para definir mejor la banda elegida y poder ajustarle así una curva lorentziana (curvas rojas de la Fig. F1) por medio de la cual se calcula la intensidad integrada de la banda (Tabla F1).

Para la determinación del FA, suponemos que la longitud de las microestructuras de Au es igual al diámetro del spot del láser del equipo Raman utilizado (micro-Raman LabRam, Horiba Jovin-Yvon, con línea de emisión de 632.8 nm de un láser de He-Ne) y que la luz láser incide solamente en el área de la superficie superior de la microestructura. Por lo que se tendrá:

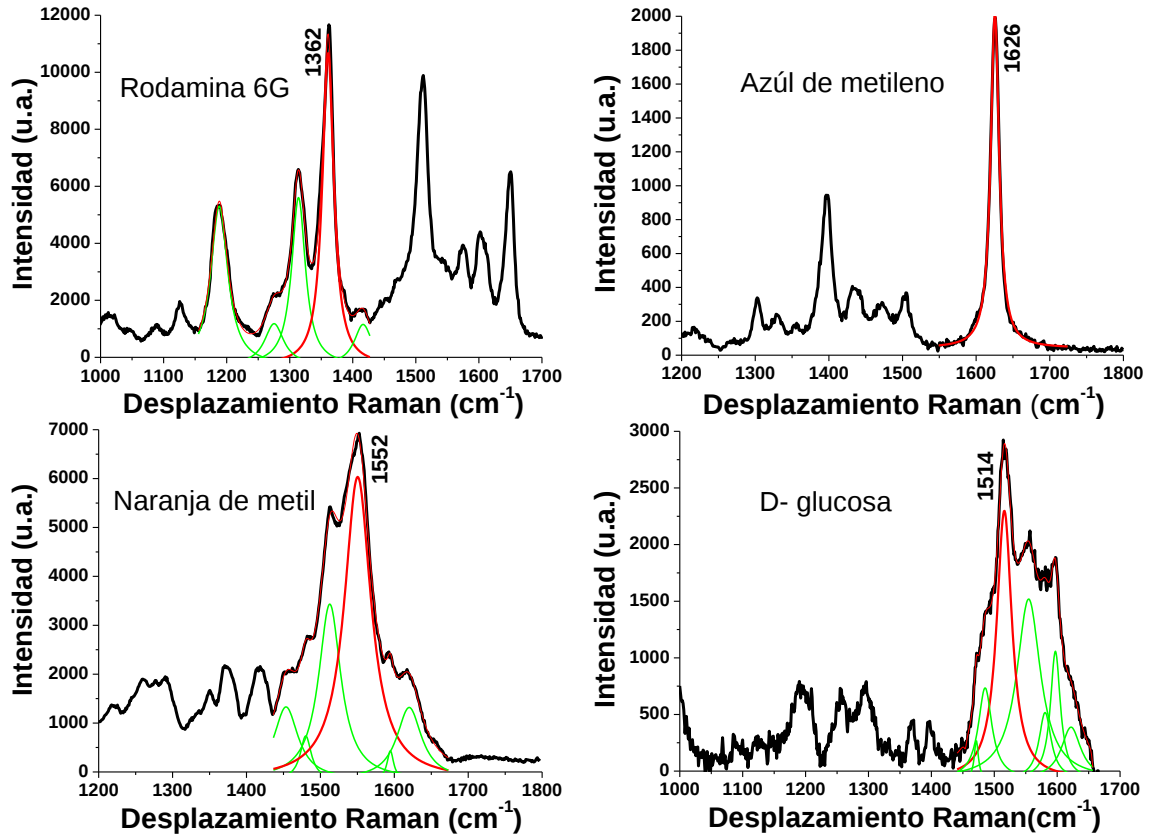


Figura F1. Gráficas de los espectros SERS de cada analito donde se indican las bandas utilizadas para calcular las intensidades integradas. Las curvas de color verde son las curvas resultantes de la deconvolución y las curvas rojas son ajustes lorentzianos.

$$A_{\mu s} = \pi r \times D_{spot} = 6.28 \times 10^{-9} m^2$$

$A_{\mu s}$ = Área de la superficie superior de la microestructura (cilindro)

D_{spot} = Diámetro del spot del láser = 1 mm

$r = \frac{D_{\mu s}}{2}$ = Radio de la microestructura = 2 μm

Si se supone que una monocapa de las moléculas fue adsorbida ($A_{molecule}$ = Área de una molécula), el número de moléculas adsorbidas sobre la superficie de la microestructura es $N_{SERS} = \frac{A_{\mu s}}{A_{molecule}}$; y el

número de moléculas bajo el spot del láser (sin sustrato SERS) es $N_{NR} = \frac{V_{exposed}}{V_{molecule}}$

Dónde: $V_{exposed} = \pi r_{spot}^2 \times D_{\mu s}$

r_{spot} = Radio del spot del láser

$V_{exposed}$ =Volumen expuesto bajo el spot del láser

El volumen y el área de las moléculas fueron estimados con la siguiente expresión:

$$V_M(m^3/mol) = (W_{molecule}) \times (Densidad) \text{ y } V_{molecule} = V_M/N_A$$

V_M =Volumen molar

$V_{molecule}$ =Volumen promedio de una molécula

Si se supone que las moléculas tienen forma esférica, entonces:

$$A_{molecule} = \pi \left(\sqrt[3]{3V_{molecule}/4\pi} \right)^2 \cdot W_{molecule} = \text{Peso molecular}$$

N_A =Número de Avogadro

Se calculó entonces N_{NR} y N_{SERS} para cada molécula; una vez determinados, los valores fueron sustituidos en la expresión para FA. En la tabla F1 se muestran los valores calculados.

Tabla F1. Los cocientes de N_{NR} y N_{SERS} y de las intensidades integradas y el FA para cada molécula.			
Moléculas	Cociente de N_{NR} y N_{SERS} $\frac{N_{NR}}{N_{SERS}}$	Intensidades integradas $\frac{I_{SERS}}{I_{NR}}$	FA $\frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{NR}/N_{NR}}$
R6G	7.049×10^6	3.765×10^4	2.654×10^{11}
MB	9.012×10^6	3.581×10^3	3.227×10^{10}
MO	8.047×10^6	3.267×10^4	2.629×10^{11}
DG	1.044×10^6	1.688×10^4	1.762×10^{10}

Apéndice F

Ubicación de las bandas SERS obtenidas para cada analito

Las tablas E1, E2, E3 y E4 presentan la asignación de las bandas Raman observadas en los espectros SERS de cada molécula. También muestran la ubicación de las mismas bandas reportadas en otros trabajos.

Las mediciones de espectroscopía Raman o de SERS son susceptibles de modificación debido a las variaciones de diversos parámetros, de tal modo que la intensidad de los modos vibracionales está asociadas con las reglas de selección Raman, la sección transversal de dispersión Raman de cada molécula, la concentración del analito y la del solvente, el sustrato SERS y la orientación de la molécula absorbida sobre la superficie; por eso, los valores de la intensidad y la posición de las bandas reportados en nuestro trabajo pueden variar con respecto a aquellos reportados previamente en la literatura.

Tabla E1. Desplazamiento Raman (cm⁻¹) y asignación de la banda del AZM

Posición de la banda (cm ⁻¹)	Asignación de la banda
448	$\delta(\text{C-N-C})^{[E1, E2, E3]}$
482	$\delta(\text{C-N-C})^{[E1, E2, E3]}$
501	$\delta(\text{C-N-C})^{[E1, E2]}$
596	$\delta(\text{C-N-C})^{[E2]}$
671	$\gamma(\text{C-H})^{[E1, E2, E3]}$
770	$\delta(\text{C-N-C}), \delta(\text{C-S-C}), \nu(\text{N-CH}_3)^{[E2]}$
886	Lo reporta: [E2] y [E1] pero no lo asignan.
951	$\gamma(\text{C-H})^{[E3]}$
1040	$\beta(\text{C-H})^{[E1, E2]}$
1155	$\beta(\text{C-H})^{[E2, E4]}$
1176	$\nu(\text{C-N})^{[E1, E5]}$
1302	Lo reporta: [E1] [E5] pero no lo asignan.
1328	$\alpha(\text{C-H})^{[E1, E2]}$
1396	$\alpha(\text{C-H}), (\text{C-H})$ in-plane ring deformation ^[E1, E5]
1432	$\nu_{\text{asym}}(\text{C-N})^{[E1, E5]}$
1504	$\delta_{\text{asym}}(\text{C-C-C})^{[E2]}$
1626	$\nu(\text{C-C})$ ring ^[E1, E2, E4, E5]
Abreviaciones: ν : stretching; α : in-plane ring deformation; β : in-plane	

bending; γ : out-of-plane bending; and δ : skeletal deformation.

Tabla E2. Desplazamiento Raman (cm^{-1}) y asignación de la banda del R6G

Posición de la banda (cm^{-1})	Asignación de la banda
611	Ring $\beta(\text{C-C-C})$ ^[E6, E7]
773	$\gamma(\text{C-H})$ ^[E6-E9]
932	Lo reporta: [E8] pero no lo asigna
1125	$\beta(\text{C-H})$ ^[E6, E9, E10]
1188	$\nu(\text{C-C})$ ^[E7]
1313	$\beta(\text{N-H})$, $w(\text{CH}_2)$ ^[E7, E8]
1362	Arom $\nu(\text{C-C})$, $\beta(\text{C-H})$ ^[E6-E9]
1511	Arom $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-N})$, (N-H) bending ^[E6-E10]
1574	Arom $\nu(\text{C-C})$, $\beta(\text{N-H})$ ^[E6, E8]
1602	Lo reporta: [E6] pero no lo asigna
1650	Arom $\nu(\text{C-C})$, $\beta(\text{C-H})$ ^[E6-E10]

Abreviaciones: ν : stretching; α : in-plane ring deformation; β : in-plane bending; γ : out-of-plane bending; and δ : skeletal deformation; w : wagging; arom: aromatic.

Tabla E3. Desplazamiento Raman (cm^{-1}) y asignación de la banda de NMO

Posición de la banda (cm^{-1})	Asignación de la banda
931	$\delta(\text{C-H})$, $\delta(\text{C-C})$ ^{[E11]*}
1022	$\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-C})$ ^[E11]
1161	$\delta(\text{N-N})$ ^[E12, E13]
1217	$\delta(\text{C-C})$ ^[E12, E13]
1258	$\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-C})$ ^[E11, E12]
1294	$\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-H})$, $\delta(\text{C-N})$ ^[E11, E14]
1370	S-ring, $\nu(\text{C-C})$ ^[E11, E13]
1418	$\nu(\text{N=N})$ ^[E11-E13, E7]
1513	-----
1552	$\delta(\text{C-H})$ ^[E13] , $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{C-C})$ ^[E14]
1592	S-ring, $\nu(\text{C=C})$ ^[E11, E13, E7]
1621	N-ring, $\nu(\text{C=C})$ ^[E13]

Abreviaciones: ν : stretching, and δ : skeletal deformation.

Tabla E4. Desplazamiento Raman (cm^{-1}) y asignación de la banda de la DG

Posición de la banda (cm^{-1})	Band assignment
909	(O-C-H)bend ^[E15] , $\nu(\text{C-O})$ ^[E16] , α -anomer ^[E17]
922	α -anomer ^{[D17], [E18]}
1067	β -anomer ^[E18] , $\nu(\text{C-H})$ ^[E19] , $\delta(\text{C-O-H})$ ^{[E17], [E20]}
1082	β -anomer ^[E21] , $\nu(\text{C1-H})$ ^[E17]
1124	β -anomer ^{[E18][E21]} ; $\nu(\text{C-O})$ ^[E20] ; $\nu(\text{C-C})$ ^[E16]
1142	$\nu(\text{C-O})$ endo ^[E20] , DT
1166-1222	$\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$ ^[E15, E22] , $\delta(\text{C-H})$, $\delta(\text{O-H})$ ^[E22]
1255	$\delta(\text{C-O-H})$ ^[E19] , DT
1296	1270 $\nu(\text{C-C} + \text{C-O})$ ^[E15] , DT
1332	α -anomer ^[E18] , $\delta(\text{C-C-H})$, $\delta(\text{O-C-H})$ ^[E22]

1348	$\delta(\text{C-C-H})^{[E15]}$
1371	$\alpha\text{-anomer}^{[E18]}\delta(\text{O-C-H})^{[E19]}$
1397	$\delta(\text{O-C-H}), \delta(\text{C-O-H}), \delta(\text{C-C-H})^{[E17, E22]}$
1514	A combination band of $\delta(\text{OCH})$ and $\delta(\text{COH})^{[E22]}$, DT
1556	-----
1597	-----
Abreviaciones: ν : stretching; α : in-plane ring deformation; β : in-plane bending; γ : out-of-plane bending, and δ : skeletal deformation. DT: Datos teóricos.	

[E1] X. Gui-Na y M. Shi-Qing. Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters* 447, 305-309, 2007.

[E2] K. Quester, M. Avalos-Borja, A. R. Vilchis-Nestor, M. A. Camacho-López y E. Castro-Longoria. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLOS ONE* 8, 2013.

[E3] L. Zhong, Y. Hu, D. Xing. Adsorption orientation of methylene blue (MB^+) on the silver colloid: SERS and DFT studies. CLEO/Pacific Rim 2009, Shanghai China, August 31-September 3, 2009.

[E4] R. R. Naujok, R. V. Duevel y R. M. Corn. Fluorescence and Fourier transform surface-enhanced Raman scattering measurements of methylene blue adsorbed onto a sulfur-modified gold electrode. *Langmuir* 9, 1771-1774, 1993.

[E5] M. P. Rodríguez-Torres, L. A. Díaz-Torres y S. Romero-Servin. Heparin assisted photochemical synthesis of gold nanoparticles and their performance as SERS substrates. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 19239-19252, 2014.

- [E6] G. Li, H. Li, Y. Mo, X. Huang y L. Chen. Surface enhanced resonance Raman spectroscopy of rhodamine 6G adsorbed on silver electrode in lithium batteries. *Chemical Physics Letters* **330**, 249-254, 2000.
- [E7] J. Cyriac, M. Wlekinski, G. Li, L. Gao y R. G. Cooks. In situ Raman spectroscopy of surfaces modified by ion soft landing. *Analyst* **137**, 1363–1369, 2012.
- [E8] L. Jensen y G. C. Schatz. Resonance Raman scattering of rhodamine 6G as calculated using time-dependent density functional theory. *Journal of Physical Chemistry A* **110**, 5973-5977, 2006.
- [E9] Y. C. Liu, K. H. Yang y T. C. Hsu. Enhancements in intensity and thermal stability of Raman spectra based on roughened gold substrates modified by underpotential deposition of silver. *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 903-907, 2009.
- [E10] Y. Lu, G. L. Liu y L. P. Lee. High-density silver nanoparticle film with temperature-controllable interparticle spacing for a tunable surface enhanced Raman scattering substrate. *Nano Letters* **5**, 5-9, 2005.
- [E11] A. Zhang y Y. Fang. Adsorption orientations and interactions of methyl orange on negatively and positively charged colloidal silver particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **305**, 270-274, 2007.
- [E12] A. Zhang y J. Zhang. Quenching and enhancing of SERS of methyl orange after the addition of chlorine and nitrate anions. *Physica B: Condensed Matter* **404**, 2435-2438, 2009.

- [E13] A. Zhang y Y. Fang. Influence of adsorption orientation of methyl orange on silver colloids by Raman and fluorescence spectroscopy: pH effect. *Chemical Physics* **331**, 55-60, 2006.
- [E14] M. Z. Si, Y. P. Kang y Z.G. Zhang. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of methyl orange in Ag colloids prepared by electrolysis method. *Applied Surface Science* **255**, 6007-6010, 2009.
- [E15] C. R. Yonzon, C. L. Haynes, X. Zhang, J. T. Walsh Jr. y R. P. A. Van Duyne. Glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: improved partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein interference. *Analytical Chemistry* **76**, 4069-4075, 2004.
- [E16] M. Rycenga, J. M. McLellan y Y. A. Xia. SERS study of the molecular structure of alkanethiol monolayers on Ag nanocubes in the presence of aqueous glucose. *Chemical Physics Letters* **463**, 166-171, 2009.
- [E17] S. Söderholm, Y. H. Roos, N. Meinander y M. Hotokka. Raman spectra of fructose and glucose in the amorphous and crystalline states. *Journal of Raman Spectroscopy* **30**, 1009-1018, 1999.
- [E18] I. Delfino, C. Camerlingo, M. Portaccio, B. Della Ventura, L. Mita, D.G. Mita y M. Lepore. Visible micro-Raman spectroscopy for determining glucose content in beverage industry. *Food Chemistry* **127**, 735-742, 2011.

- [E19] H. Chen, J. Luo, T. Zeng, L. Jiang, Y. Sun, Z. Jiao, Y. Jin y X. Sun. Investigation of the synthesis, SERS performance and application in glucose sensing of hierarchical 3D silver nanostructures. *New Journal of Chemistry* **38**, 3907-3916, 2014.
- [E20] M. Kacuráková y M. Mathlouthi. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. *Carbohydrate Research* **284**, 145-157, 1996.
- [E21] G. Cerchiaro, A. C. Sant'Ana, M. Temperini y A. M. da Costa Ferreira. Investigations of different carbohydrate anomers in copper (II) complexes with D-glucose, D-fructose, and D-galactose by Raman and EPR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **340**, 2352-2359, 2005.
- [E22] M. Ibrahim, M. Alaam, H. El-Haes, A. F. Jalbout y A. de Leon. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química* **31**, 15-21, 2006.