

Producción de nanopartículas metálicas mediante el uso de los hongos: una alternativa contra microorganismos patógenos

Ernestina Castro-Longoria¹

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v1i1.2> Ciudad de México

Resumen

Las nanopartículas metálicas (NPs) como las de plata, oro, cobre y otros metales han demostrado ser efectivas contra microorganismos que presentan multirresistencia a los antibióticos convencionales. Es por ello que actualmente se investiga el uso de materiales biológicos como agentes reductores para la producción de NPs, como una alternativa eco-amigable. Diversos materiales biológicos como bacterias, hongos, plantas, algas, etc., han sido utilizados para sintetizar NPs metálicas. No obstante, los hongos son microorganismos que presentan mayor ventaja sobre otros sistemas biológicos ya que poseen una alta tasa de crecimiento, requieren de nutrientes simples y son de fácil manejo en el laboratorio. Hasta el momento hemos llevado a cabo con éxito la producción de NPs de diversos metales utilizando

especies de hongos no patógenos. En particular las NPs de plata y cobre poseen excelentes propiedades antimicrobianas y una de las principales ventajas es que presentan baja toxicidad en líneas celulares de mamíferos. En esta nota se resume el trabajo realizado hasta el momento y se espera que en un corto plazo se lleven a cabo los ensayos de laboratorio *in vivo*, para demostrar su eficacia y a sí poder presentarlos como una alternativa para los casos donde las infecciones microbianas no respondan a los antibióticos convencionales.

Palabras clave:

Nanopartículas, biosíntesis, antimicrobianos.

¹ Investigador Titular D. Departamento de Microbiología. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, México.

*Autor de correspondencia. E-mail: ecastro@cicese.mx

Introducción

Desde tiempos antiguos se conocen las propiedades antimicrobianas de la plata, y en las últimas décadas el uso de plata nanométrica y otros nanometales se han presentado como una alternativa para el manejo de la resistencia microbiana a los antibióticos convencionales.

Las nanopartículas (NPs) metálicas pueden producirse mediante métodos físicos y químicos, los cuales involucran una gran cantidad de energía y el uso de algunos químicos potencialmente tóxicos. Es por ello que una gran variedad de agentes biológicos se han propuesto para producir NPs (Quester et al., 2013). Dentro de los materiales biológicos que se han utilizado, los hongos han sido identificados como una excelente alternativa, eco-amigable, para la producción de NPs de diversos metales (Castro-Longoria, 2016). Los hongos son microorganismos degradadores de materia orgánica, por lo tanto tienen el potencial de secretar una gran cantidad de enzimas y metabolitos secundarios. Tanto los componentes intracelulares como los compuestos secretados al medio, pueden utilizarse para la formación y estabilización de las NPs.

Para llevar a cabo la biosíntesis de NPs metálicas se han utilizado con éxito diferentes protocolos, como el uso de la biomasa fúngica, el filtrado libre de células, el extracto de hongos y el sobrenadante de cultivos líquidos. El uso de extractos y sobrenadantes resulta ventajoso ya que no se tiene que resolver el problema de la extracción de las NPs de la biomasa del hongo (Castro-Longoria, 2016).

La biosíntesis de NPs mediante el uso de hongos representa una alternativa económica, eco-amigable y biocompatible que potencia la aplicación de las NPs obtenidas en biomedicina, ya que diversos estudios han reportado que las NPs de algunos metales poseen excelente actividad antimicrobiana contra bacterias hongos y virus, incluso contra microorganismos multirresistentes (Castro-Longoria et al., 2017). Además, algunas especies de hongos secretan moléculas con actividad antimicrobiana y se ha demostrado que las NPs obtenidas son aún más efectivas para inhibir microorganismos patógenos. Un aspecto fundamental para sugerir su uso en la clínica, es realizar estudios de citotoxicidad para comprobar que las NPs obtenidas no posean alta toxicidad en células de mamíferos, así como realizar los ensayos de laboratorio *in vivo*.

Nuestro grupo de investigación busca obtener NPs biocompatibles que puedan ser utilizadas como microbicidas. Resultados recientes utilizando especies de hongos no patógenos para la producción de NPs de plata han demostrado una alta efectividad para la inhibición de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, a concentraciones menores o iguales a 10 µg/ml. Cabe señalar que las NPs obtenidas conservan sus propiedades antibacterianas aún después de un año de estar almacenadas a temperatura ambiente, lo cual es importante para un uso exitoso. Además, los ensayos de citotoxicidad en fibroblastos mostraron baja citotoxicidad, por lo que podrían tener uso potencial en la clínica. Queda por realizar la evaluación en modelos *in vivo* para demostrar su efectividad y determinar su efecto a nivel sistémico.

Biosíntesis de NPs metálicas mediante el uso de los hongos

La biosíntesis de NPs metálicas utilizando hongos fue reportada por primera vez en el 2001. A partir de entonces, una cantidad creciente de especies de hongos se han utilizado y reportado como una alternativa más limpia para la producción de NPs (Castro-Longoria, 2016). La lista de especies de hongos reportada para la producción de NPs va en aumento y algunos estudios han incluido el uso potencial de las NPs obtenidas. Tal es el caso de las NPs de plata, cobre, oro y zinc, que se han propuesto para ser utilizadas como agentes antimicrobianos. En el caso de las NPs de oro, estas también podrían tener uso potencial para tratamientos contra el cáncer. Incluso, algunas formas y tamaños de NPs de oro biosintetizadas con el extracto del hongo *Neurospora crassa* (Figura 1A) se han propuesto para uso potencial en la detección de moléculas mediante espectroscopía Raman reforzada por efectos de superficie (SERS) (Quester et al., 2013).

Como se mencionó previamente, el uso de hongos no patógenos es una excelente alternativa para la síntesis de NPs, sobre todo si se busca una aplicación médica. En nuestro grupo de trabajo se han utilizado

mayormente hongos considerados seguros para el humano. En los primeros trabajos de investigación se utilizó la biomasa del hongo *N. crassa* para la producción de NPs de plata, oro, bimetalicas de oro y plata (Castro-Longoria et al., 2011) y platino (Castro-Longoria et al., 2012). Esta especie de hongo es utilizada como organismo modelo para diversos estudios de Biología celular y molecular y es considerada no patógena para plantas, animales y humanos. En estudios subsecuentes se han utilizado los extractos y/o sobrenadantes de cultivos líquidos (Quester et al., 2013, 2016).

Actualmente se están utilizando los hongos *Lentinus* y *Ganoderma* para la biosíntesis de NPs de plata y cobre (Figura 1B-C). Estas especies de hongos son comestibles y se han utilizado tradicionalmente en países asiáticos ya que se les atribuyen propiedades medicinales. También se está trabajando con especies del hongo *Trichoderma*, estos hongos son utilizados como bioremediadores en cultivos agrícolas y en general se consideran seguros. Sin embargo, como medida precautoria los extractos y sobrenadantes de cultivos líquidos utilizados para la síntesis, son ultracentrifugados para eliminar la biomasa. Posteriormente son filtrados con filtros de 0.22 μm de tamaño de poro para eliminar todo resto de biomasa que pudiera contener el líquido en donde se cultiva el hongo.

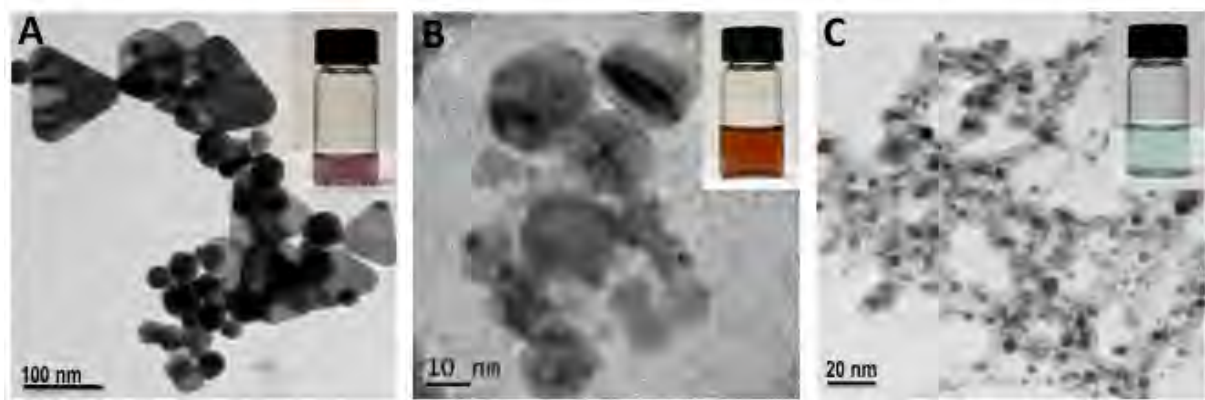


Figura 1. Micrografías de nanopartículas metálicas sintetizadas mediante extractos de hongos y analizadas bajo microscopía electrónica de transmisión. **(A)** nanopartículas de oro, **(B)** plata y **(C)** cobre. En los recuadros se muestran las suspensiones de cada tipo de nanopartícula.

Aplicación de nanopartículas metálicas contra microorganismos patógenos

Las NPs metálicas tienen un gran potencial como agentes antimicrobianos. En particular, las de plata han sido evaluadas para la inhibición de hongos y bacterias y se han reportado excelentes resultados. En el mercado se pueden encontrar productos impregnados de plata coloidal y con NPs de plata, incluidos Acticoat®, Aquacel® Ag, Contreet®, Actisorb® Silver 220, Urgotul SSD® y Avance® entre otros (Dowsett, 2004). Estos productos se utilizan para tratar infecciones en heridas quirúrgicas, quemaduras y heridas crónicas como úlceras en las piernas (Lansdown, 2004), sin embargo hasta donde tengo conocimiento, la aplicación directa de soluciones de plata todavía no se realiza. Lo que si es claro es que la cantidad de plata en tamaños nanométricos es mucho menor que la plata coloidal, la cual incluso se vende para consumo directo. Sin embargo hacen falta estudios para determinar si la aplicación tópica es segura. Aunque el uso en pacientes solo sería recomendable para aquellos que presenten infecciones cutáneas que no

respondan a los antibióticos convencionales. El mecanismo de acción de las NPs de plata contra los microorganismos incluye la generación de especies reactivas de oxígeno, daño en pared y membrana celular y daño en el ADN. En *Candida albicans* se determinó que las NPs de plata se adhieren a la pared celular liberando iones que al internalizarse forman pequeñas NPs, las cuales terminan destruyendo el material intracelular causando la muerte del hongo (Vázquez-Muñoz, et al., 2014). En otro estudio se evaluó la capacidad antimicrobiana de un irrigante dental modificado con NPs de plata contra *C. albicans* y *Staphylococcus aureus* y se encontró que fue capaz de inhibir el crecimiento tanto de células planctónicas como biopelículas (Martínez-Andrade et al., 2018). Las NPs de plata se observaron cubriendo la superficie de pseudo-hifas de *C. Albicans* (Figura 2A) así como la forma levaduriforme (Figura 2 B). En el caso de *S. aureus*, las células también se encontraron con NPs adheridas en gran parte de la superficie (Figura 2C-D). Los resultados obtenidos demuestran que las NPs metálicas tienen un alto potencial para su uso en la clínica.

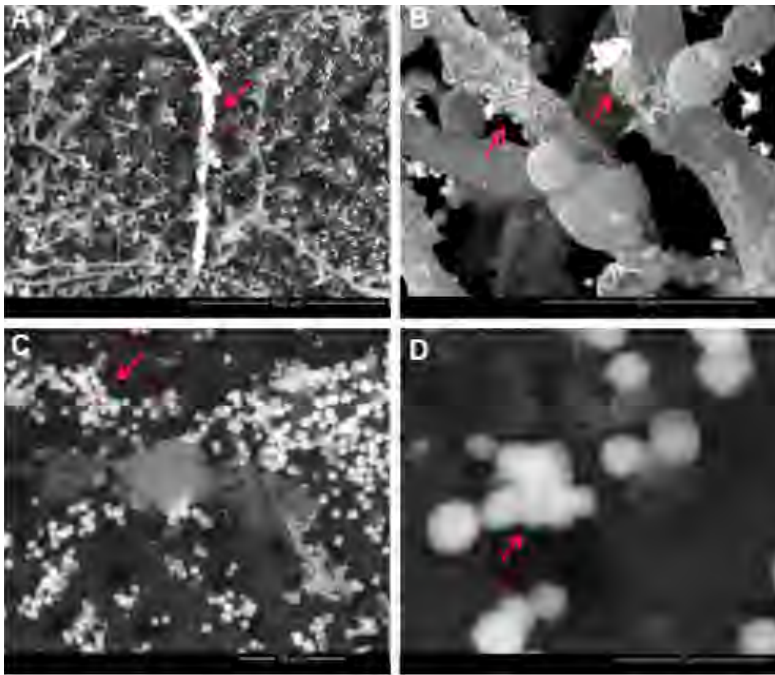


Figura 2. Micrográficas de microscopía electrónica de barrido de microorganismos expuestos a nanopartículas de plata. (A-B) biopelícula de *Candida albicans*, (C-D) biopelícula de *Staphylococcus aureus*. En (B) y (D) se muestra una amplificación en la que se observa a la mayoría de las células cubiertas por nanopartículas. Las flechas indican algunas de las células completamente cubiertas por nanopartículas de plata.

Mediante el desarrollo de métodos eco-amigables para la producción de NPs metálicas se ha logrado la síntesis de partículas de tamaños pequeños, con un rango de tamaños de 1-60 nm (Figura 1B-C). Numerosos artículos científicos han reportado que este rango de tamaño es óptimo para la inhibición de bacterias patógenas. Se ha reportado que las NPs de plata de tamaños iguales o menores a 10 nm son muy eficientes para la inhibición de patógenos porque cubren una mayor superficie del microorganismo, además que liberan una mayor cantidad de iones (Ag^+), los cuales son microbicidas incluso a bajas concentraciones. Esto fue corroborado con NPs de plata obtenidas mediante el hongo *N. crassa*. Se evaluaron las NPs para determinar su capacidad antifúngica contra tres especies del hongo patógeno *Candida*. Se obtuvieron mejores resultados con NPs de 1-10 nm de diámetro y la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *C. albicans*, *C. parapsilopsis* y *C. glabrata* (Quester, 2014).

Las NPs de plata obtenidas mediante el uso de los hongos *Ganoderma* y *Lentinus* también son de tamaño pequeño, con un rango de 1-20

nm y mostraron excelente inhibición contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue menor o igual a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para estas bacterias. Los ensayos de citotoxicidad con fibroblastos mostraron que a las concentraciones necesarias para la inhibición de las bacterias la toxicidad fue baja. Adicionalmente, las NPs se evaluaron después de más de un año de haber sido sintetizadas y almacenadas a temperatura ambiente y se observó que conservan sus propiedades antimicrobianas. Estos resultados demuestran que las NPs obtenidas son estables y no pierden efectividad con el paso del tiempo. Sin embargo, como se mencionó previamente es necesaria su evaluación en modelos *in vivo* para poder proponerse como una alternativa en casos de infecciones cutáneas en donde los patógenos no respondan ante los antibióticos convencionales.

Agradecimientos

Gracias al Dr. Alfredo Vilchis Nestor por el apoyo para análisis de muestras de HRTEM, al M.C. Juan Manuel Martínez Andrade por los análisis de SEM y al LINAN-IPICYT.

Referencias

1. Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011; 83: 42-48.
2. Castro-Longoria E, Moreno-Velázquez SD, Vilchis-Nestor AR, Arenas-Berumen E, Avalos-Borja M. Production of platinum nanoparticles and nanoaggregates using *Neurospora crassa*. *J Microbiol Biotechnol*. 2012 Jul;22(7):1000-4. doi: 10.4014/jmb.1110.10085.
3. Castro-Longoria, Ernestina. Fungal biosynthesis of nanoparticles, a cleaner alternative. En: *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology*. Springer. 2016; p. 323-351.
4. Castro-Longoria, E, GariboRuiz D, Martínez-Castro S. Myconanotechnology to treat infectious diseases: A perspective. *Fungal Nanotechnology*. Springer. 2017; p. 235-261.
5. Dowsett C. The use of silver based dressings in wound care. *Nurs Stand*. 2004; 19(7):56–60.
6. Lansdown AB. A review of the use of silver in wound care: facts and fallacies. *Br J Nurs* 13(6 Suppl).2004;6–17
7. Martínez-Andrade JM, Avalos-Borja M, Vilchis-Nestor AR, Sánchez-Vargas LO, Castro-Longoria E. Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment-A novel modification. *PLoS One*. 2018 Jan 18;13(1):e0190866. doi: 10.1371/journal.pone.0190866.
8. Quester K, Avalos-Borja M, Vilchis-Nestor AR, Camacho-López MA, Castro-Longoria E. SERS properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e77486. doi: 10.1371/journal.pone.0077486.
9. Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. 2013 Nov-Dec;54-55:1-27. doi: 10.1016/j.micron.2013.07.003.
10. Quester K. The use of *Neurospora crassa* soluble proteins as bioreducing agent for the production of gold and silver nanostructures. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 2014; 166 pp.
11. Quester K, Avalos-Borja M, Castro Longoria E. 2016. Controllable synthesis of silver nanoparticles using fungal extract. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 7: 118-125. doi: org/10.4236/jbnb.2016.72013
12. Vázquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLOS ONE*. 2014; 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0108876.